

**DESAIN PRIMER GEN α -AMILASE SECARA *INSILICO* PADA
Penicillium sp. DARI BATUBARA**

SKRIPSI

Oleh:

**Dita Trisnasari
NIM. 14630051**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**DESAIN PRIMER GEN α -AMILASE SECARA *IN SILICO* PADA
Penicillium sp. DARI BATUBARA**

SKRIPSI

**Oleh:
DITA TRISNASARI
NIM 14630051**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**DESAIN PRIMER GEN α -AMILASE SECARA *IN SILICO* PADA
Penicillium sp. DARI BATUBARA**

SKRIPSI

Oleh:
Dita Trisnasari
NIM. 14630051

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 29 Desember 2020

Pembimbing I




Akyunul Jannah, S.Si M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Pembimbing II



Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 19731212 199803 1 008

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**DESAIN PRIMER GEN α -AMILASE SECARA *IN SILICO* PADA
Penicillium sp. DARI BATUBARA**

SKRIPSI

**Oleh:
DITA TRISNASARI
NIM. 14630051**

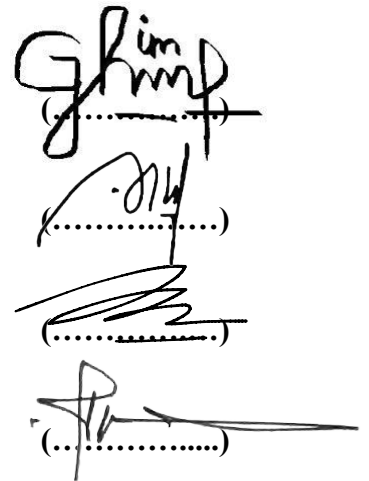
**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)
Tanggal 29 Desember 2020**

**Penguji Utama : A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIDT.19760105 20180201 2 248**

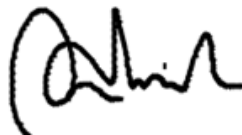
**Ketua Penguji : Dewi Yuliani, M.Si
NIDT. 19830125 20160801 2 068**

**Sekretaris Penguji : Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIDT. 19880711 20160801 2 067**

**Anggota Penguji : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.
NIP. 19731212 199803 1 008**



**Mengetahui,
Ketua Jurusan**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 197906202006042 002**

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dita Trisnasari
Nim : 14630051
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : "Desain Primer Gen α -Amilase Secara *In silico* Pada
Penicillium sp. Dari Batubara"

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia mempertanggungjawabkan sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 29 Desember 2019



Yang membuat pernyataan,


Dita Trisnasari
14630051

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji syukur bagi Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang, atas segala nikmat dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian yang berjudul “**Desain Primer Gen α -Amilase Secara *In silico* Pada *Penicillium sp.***” dengan sebaik mungkin. Shalawat serta salam selalu penulis haturkan pada Nabi Muhammad SAW, yang menjadi suri tauladan bagi kita semua.

Penulis menyadari bahwa penyusunan proposal penelitian ini tidak akan terwujud tanpa adanya bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ayah dan Ibu serta keluarga besar tercinta . Terimakasih atas segala do’a, kepercayaan, cinta kasih yang tiada henti diberikan kepada penulis, dan senantiasa memberikan motivasi yang luar biasa sehingga mampu memberikan motivasi dan semangat yang sangat berarti bagi penulis.
2. Pratu M. Roni S.T selaku teman hidup, dan Letnan Cahyo Tri Wibowo S.Tr.(Han). selaku kakak tercinta. terimakasih atas motivasi yang diberikan sehingga penulis tetap semangat mengerjakan.
3. Dr. Akyunul Jannah. S.Si M.P selaku dosen pembimbing yang telah memberikan banyak arahan, masukan, serta motivasi dalam membimbing penulis untuk dapat menyelesaikan proposal penelitian ini dengan baik.
4. Ibu Dewi Yuliani M.Si selaku penguji yang telah sabar untuk menunggu saya dan membimbing saya, dan menjelaskan point demi point supaya penulis memahami semua penelitian ini.

5. Dr. H. Ahmad Barizi, M.A dan Bapak A. Ghanaim Fasya M.Si selaku penguji terimakasih untuk ilmu yang diberikan kepada penulis.
6. Seluruh dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
7. Teman–teman mahasiswa angkatan 2014, terutama teman-teman “*BIOGEN Team*” yang telah banyak membantu penulis dan memberikan dukungan dalam menyusun proposal penelitian ini.
8. Kepada semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa moril maupun materi.

Penulis menyadari bahwa laporan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna. Oleh sebab itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan proposal penelitian ini. Semoga laporan hasil penelitian ini dapat menjadi sarana pembuka tabir ilmu pengetahuan baru dan bermanfaat bagi kita semua, Amin.

Malang, 19 November 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
SURAT PERNYATAAN ORISINALITA PENELITIAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
ن بذة مة صرة	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3. Tujuan	5
1.4. Batasan Masalah	5
1.5. Manfaat	5
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 6
2.1. Tinjauan Islam Tentang Ilmu Genetika	6
2.2. Enzim α -Amilase	9
2.3. Gen Penyandi α -Amilase pada <i>Penicillium</i>	10
2.4. Asam Amino dan Struktur Enzim α -Amilase	11
2.5. <i>Polimer Chain Reaction</i> (PCR)	12
2.6. DNA Template.....	13
2.7. Desain Primer.....	14
 BAB III METODE PENELITIAN.....	 16
3.1. Pelaksanaan Penelitian.....	16
3.2. Alat dan Bahan.....	16
3.2.1. Alat.....	16
3.2.2. Bahan	16
3.3. Tahapan Penelitian.....	17
3.4. Cara Kerja	17
3.4.1. Pengamatan Morfologi	17
3.4.2. Penentuan DNA template	17
3.4.3. Desain primer.....	18
3.4.4. Analisis Data.....	19
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	 20
4.1. Analisis Morfologi Jamur <i>Penicillium sp.</i>	20
4.2. Penentuan DNA Template	21
4.3. Desain Primer.....	24

BAB V PENUTUP	27
5.1 Kesimpulan	27
5.2 Saran	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	30

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Data gen amilase dari berbagai jenis spesies <i>Penicillium</i>	21
Tabel 4.2	Hasil Desain Primer <i>Penicillium sp. 'occitanis'</i> strain CL100 contig_433 (NPFK01000433)	24

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Urutan gen penyandi pada <i>Penicillium sp. 'occitanis'</i> strain CL100 contig_433, whole genom shotgun sequence 1840 pb	10
Gambar 2.2	Urutan gen penyandi α -amilase dari <i>Penicillium expansum</i> strain MD-8 chromosome Unknown contig348, whole genome shotgun sequence 2027 pb.....	11
Gambar 2.3	Urutan asam amino α -amilase <i>Penicillium sp. AIF73124.1</i>	12
Gambar 2.4	Struktur 3 dimensi α -amilase.....	12
Gambar 2.5	Tiga tahapan utama pada <i>Polymerase Chain Reaction</i> PCR.....	13
Gambar 3.1	Halaman depan Primer-BLAST	18
Gambar 4.1	Pengamatan Morfologi isolat A BTBR menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40X	20
Gambar 4.2	Urutan Nukleotida <i>Penicillium sp. 'occitanis'</i> sekuen penuh dengan panjang 1840 bp.....	23
Gambar 4.3	Posisi penempelan kandidat primer pada <i>template P. sp. 'occitanis'</i> (NPFK01000433) dengan panjang basa 1840 bp...	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Sepuluh gen α -amilase dari berbagai spesies <i>Penicillium</i>	30
Lampiran 2	Penjajaran tiga urutan α -amilase untuk menentukan <i>template</i>	37
Lampiran 3	Karakteristik primer hasil desain	40

ABSTRAK

Trisnasari, Dita. 2018. **Desain Primer Gen α -Amilase Secara *In silico* Pada *Penicillium sp.* Dari Batubara** Proposal penelitian. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Akyunul jannah. S.Si M.P; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si.

Kata kunci : Desain Primer, Gen α -Amilase, *Penicillium sp.*, *Primer Designing Tool*.

Enzim α -amilase adalah enzim yang dapat mendegradasi ikatan α -1,4-glikosidik pada pati. Isolasi gen α -amilase dapat dimulai dengan melakukan perancangan primer secara *in silico*. Penelitian ini bertujuan mendesain primer yang sesuai untuk gen α -amilase pada jamur *Penicillium sp.* Proses perancangan dilakukan menggunakan *software primer designing tool* dari NCBI. Diperoleh 10 kandidat primer yang dihasilkan, dan dipilih 3 pasang primer, yaitu primer 1 terdiri dari *forward* 5' CTGCACCGGAGTTTGAGAGT 3' *reverse* 3' TCCGTCTTGACTCCGCTCTA 5', pasang primer 3 terdiri dari *forward* 5' CGACGTCAGTCCCAGTTTGA 3' *reverse* 3' ATGAATGGCGCTCACGATCT 5', dan pasang primer kombinasi antara primer 6 (*forward*) dan 8 (*reverse*) terdiri dari *forward* 5' CTGTTAGGCACTGGCTCTCC 3' *reverse* 3' GCTTATCACGGCTACTGGCA 5'. Hasil desain primer yang dilakukan, primer yang didapat memenuhi syarat primer yang baik untuk digunakan, yaitu memiliki panjang 20, nilai %GC masih pada rentang 40-60%, dan nilai Tm pada rentang 55-80°C.

ABSTRACT

Trisnasari, Dita. 2018. **Primary Design of α -Amylase Gene by *In silico* at *Penicillium sp.* From Coal** Research proposal. Department of Chemistry Faculty of Science and Technology State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Akyunul jannah. S.Si M.P; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si.

Keywords: Primary Design, Gene α -Amylase, *Penicillium sp.*, *Primer Designing Tool*.

The α -amylase enzyme is an enzyme that can degrade α -1,4-glycosidic bonds in starch. Isolation of the α -amylase gene can be started by conducting *in silico* primary design. This study aims to design a suitable primer for the α -amylase gene in the fungus *Penicillium sp.* The planning process is carried out using the primary software designing tool from NCBI. 10 primary candidates were obtained, and 3 primary pairs were selected, namely primary 1 consisting of forward 5' 'CTGCACCGGAGTTTGAGAGT' 3' reverse 3' 'TCCGTCTTGACTCCGCTCTA' 5', primary pairs 3 consisting of forward 5' 'CGACGTCAGTCCCAGTTTGA' 3' reverse 3' 'ATGAATGGCGCTCACGATCT' 5', and pairs of combination primers are 6 (forward) and 8 (reverse) which consist of forward 5' 'CTGTTAGGCACTGGCTCTCC' 3' reverse 3' 'GCTTATCACGGCTACTGGCA' 5'. The primary design results are carried out, the primer obtained meets the requirements of a good primer to use, which has a length of 20, % GC values are still in the range 40-60%, and T_m values are in the range 55-80 ° C.

تريسناساري ، دينا. 2018. التصميم الأولي لـ α -Amylase بواسطة Insilico في *Penicillium sp*. من اقتراح أبحاث الفحم. قسم الكيمياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا ، مولانا مالك إبراهيم الدولة الإسلامية جامعة مالانج. المستشار الأول: اء ين الجنة ؛ الاستشاري: ديوي يولياني .

الكلمات المفتاحية: التصميم الأساسي ، جين α -Amylase ، *Penicillium sp* ، أداة التصميم الأولية.

إنزيم α -amylase هو إنزيم يمكنه تحلل روابط α -1-glycosidic في النشا. يمكن بدء عزل جين α -amylase عن طريق إجراء التصميم الأولي للسيليكون. تهدف هذه الدراسة إلى تصميم أساس مناسب لجين α -amylase في الفطر *Penicillium sp*. يتم تنفيذ عملية التخطيط باستخدام أداة تصميم البرامج الأساسية من NCBI. تم الحصول على 10 مرشحين أوليين ، وتم اختيار 3 أزواج أولية ، وهي أول 1 يتكون من 5 '3' CTGCACCGGAGTTTGAGAGT ' عكس 3 'TCCGTCTTGACTCCGCTCTA ' ، أزواج أولية 3 تتكون من 5 '3' CGACGTCAGTCCCAGTTTGA ' عكس 3 'ATGAATGGCGCTC' و تتكون أزواج التوليفات الأولية من 6 (أمامي) و 8 (عكسي) من 5 '3' CTGTTAGGCACTGGCTCTCC ' عكس 3 'GCTTATCACGGCTACTGGCA ' . يتم تنفيذ نتائج التصميم الأولية ، وتفي البادئات التي تم الحصول عليها بمتطلبات جهاز تمهيدي جيد للاستخدام ، والذي يبلغ طوله 20 ، لا تزال قيم GC في النطاق 40-60٪ ، وقيم Tm في النطاق 55-80 درجة مئوية.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim amilase adalah enzim yang mendegradasi substrat amilum. Enzim amilase yang bertugas untuk memecah pati dikelompokkan menjadi 2, yaitu α -amilase, dan β -amilase. Enzim α -amilase (1,4- α -D-glukan glukanohidrolase; EC 3.2.1.1) adalah enzim yang dapat mendegradasi ikatan α -1,4-glikosidik pada pati, dengan cara memutus ikatan α -1,4-glikosidik (Poliana, 2007). Hasil degradasi enzim ini berupa glukosa, maltosa, unit maltotriosa, atau gula yang lebih sederhana (Akcan *et al.*, 2011).

Enzim α -amilase memiliki peran yang penting di dunia industri seperti industri makanan dan detergen yang berguna untuk menghidrolisis pati (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). Pada industri pembuatan minuman beralkohol, enzim α -amilase mengubah karbohidrat menjadi gula sederhana yang selanjutnya dapat diubah menjadi etanol. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Al Qur'an surat Al-Baqarah ayat 164.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ
وَالْفُلْكِ الَّتِي تَجْرِي فِي الْبَحْرِ بِمَا يَنْفَعُ النَّاسَ وَمَا أَنْزَلَ
اللَّهُ مِنَ السَّمَاءِ مِنْ مَّاءٍ فَأَحْيَا بِهِ الْأَرْضَ بَعْدَ مَوْتِهَا وَبَثَّ
فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَتَصْرِيفِ الرِّيْحِ وَالسَّحَابِ الْمُسَخَّرِ
بَيْنَ السَّمَاءِ وَالْأَرْضِ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿١٦٤﴾

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang, bahtera yang berlayar di laut membawa apa yang berguna bagi manusia, dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air, lalu dengan air itu Dia hidupakan bumi sesudah mati (kering)-nya dan Dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan, dan pengisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi; sungguh (terdapat) tanda-tanda (keesaan dan kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan (Al-Baqarah: 164).”

Ayat diatas dijelaskan dalam *Tafsir Jalalain* yang mengatakan bahwa (ciptaan allah SWT yang ada di langit dan dibumi) yakni keajaiban-keajaiban yang terdapat pada keduanya (serta pergantian malam dan siang) dengan datang dan pergi, bertambah serta berkurang, (serta perahu-perahu) atau kapal-kapal (yang berlayar di lautan) tidak tenggelam atau terpaku di dasar laut (dengan membawa apa yang berguna bagi manusia) berupa barang-barang perdagangan dan angkutan, (dan apa yang diturunkan Allah dari langit berupa air) hujan, (lalu dihidupkan-Nya bumi dengannya) yakni dengan tumbuhnya tanam-tanaman (setelah matinya) maksudnya setelah keringnya (dan disebarkan di bumi itu segala jenis hewan) karena mereka berkembang biak dengan rumput-rumputan yang terdapat di atasnya, (serta pengisaran angin) memindahkannya ke utara atau ke selatan dan mengubahnya menjadi panas atau dingin (dan awan yang dikendalikan) atas perintah Allah SWT, sehingga ia bertiup ke mana dikehendaki-Nya (antara langit dan bumi) tanpa ada hubungan dan yang mempertalikan (sungguh merupakan tanda-tanda) yang menunjukkan keesaan Allah SWT (bagi kaum yang memikirkan) serta merenungkan.

Aplikasi enzim dalam dunia industri terhitung lebih dari 80% pemakaian enzim di pasar global (Miguel *et al.*, 2013). Penjualan enzim mencapai sekitar US\$ 2 milyar pada tahun 2004 dan diperkirakan mencapai US\$ 11 juta pada tahun 2006 (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006). Penjualan Enzim α -amilase bernilai 3,1

milyar US\$ pada tahun 2009 dan mencapai 3,6 milyar US\$ pada tahun 2010. Nilai ini diperkirakan terus meningkat dan akan mencapai 6 milyar US\$ pada tahun 2016 (BBC, 2014). Peningkatan kebutuhan enzim α -amilase dalam industri yang semakin besar mendasari untuk dilakukannya penelitian dan eksplorasi enzim α -amilase dari berbagai sumber.

Enzim α -amilase umumnya diisolasi dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Sivaramakrishnan, dkk., 2006). Mikroorganisme yang banyak digunakan untuk menghasilkan α -amilase adalah bakteri dan jamur. Pada umumnya jamur banyak digunakan sebagai penghasil α -amilase karena memiliki kelebihan diantaranya α -amilase yang dihasilkan jamur lebih stabil jika dibandingkan dengan α -amilase yang dihasilkan oleh bakteri sehingga lebih menguntungkan jika digunakan dalam kepentingan industri (Suganthi, dkk., 2011). Mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim α -amilase adalah jamur seperti *Aspergillus sp.* dan *Pennicillium sp.* (Sivaramakrishnan, dkk., 2006).

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi jamur amilolitik dengan aktivitasnya sebesar 1,33. Isolat dari jamur amilolitik teridentifikasi berdasarkan *Internal Transcribe Spacer* (ITS) memiliki kekerabatan terdekat dengan *Penicillium Sublateritium* dengan similaritas sebesar 94,66% (Khoir, 2018). Pada penelitian ini akan dilakukan desain primer untuk gen α -amilase pada isolat *Penicillium* hasil isolasi dari batu bara dengan tujuan untuk mengetahui homologi dengan suatu mikroorganisme lain penghasil α -amilase dan karakteristik gen α -amilase.

Gen α -amilase dari *Penicillium sp* diamplifikasi dengan metode PCR. Komponen-komponen yang penting pada proses amplifikasi adalah DNA

template dan sepasang primer. DNA template merupakan DNA untai ganda yang membawa urutan basa fragmen yang akan digandakan, didalam proses PCR DNA template memiliki fungsi sebagai cetakan untuk pembentukan molekul DNA yang baru. Primer merupakan oligonukleotida yang berguna untuk mengagit bagian awal dan akhir daerah gen yang di amplifikasi. Pada tahapan isolasi gen α -amilase dibutuhkan sepasang primer agar dapat dilakukan proses isolasi tersebut, tahapan yang pertama dilakukan adalah dengan cara harus mengetahui primer yang akan digunakan, sebelum itu tahapan yang paling penting adalah desain primer.

Desain primer adalah proses perancangan sebuah primer dengan tujuan agar memperoleh sebuah primer yang baik untuk proses amplifikasi. Primer yang baik mampu menempel pada DNA template dari jamur *Penicillium* sp. Penelitian yang sama dari jamur *Aspergillus* telah berhasil menemukan primer yang digunakan pada proses PCR, yaitu pasangan primer (AmyFP 5'-CATCTGGATCACCCCGTTA-3' dan AmyRP 5'-AGACTTACGAAGCGAACCGT-3') (Oghenetega *et al.*, 2018). Pada proses PCR tersebut akan menghasilkan sebuah pita tebal dengan panjang 2027-2054 pb. Setiap satu siklus PCR terdapat 3 tahapan yang berlangsung, yaitu: denaturasi, *annealing* dan elongasi dan masing-masing membutuhkan kondisi yang optimum. Kondisi optimum PCR pada jamur *Penicillium* mulai dari denaturasi, *annealing* dan elongasi berturut-turut adalah 94°C selama 30 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 5 menit dengan 35 siklus (Oghenetega, dkk., 2018).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana urutan primer yang potensial untuk isolasi gen α -amilase?

1.3 Tujuan

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan yaitu untuk mengetahui urutan primer yang potensial untuk isolasi gen α -amilase.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah software yang digunakan untuk mendesain primer adalah *primer designing tool* dari NCBI (National Center for Biotechnology Information).

1.5 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah memberi informasi tentang primer yang dapat digunakan untuk mengisolasi gen α -amilase dari jamur *Penicillium*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Islam Tentang Ilmu Genetika

Ilmu genetika mendefinisikan dan menganalisis keturunan (heredity) atau konstansi dan perubahan pengaturan dari berbagai fungsi fisiologis yang membentuk karakter organisme. Unit keturunan (gen) adalah suatu segmen DNA yang nukleotidanya membawa informasi karakter biokimia atau fisiologis tertentu. Pendekatan tradisional pada genetika telah mengidentifikasikan gen sebagai dasar kontribusi karakter fenotip atau karakter dari keseluruhan struktural dan fisiologis dari suatu sel atau organisme, karakter fenotip seperti warna mata pada manusia atau resistensi terhadap antibiotik pada bakteri, pada umumnya diamati pada tingkat organisme (Jawets, 2001).

Variasi fenotif telah diamati berdasar kemampuan gen untuk tumbuh dibawah kondisi terseleksi, misalnya bakteri yang mengandung satu gen yang resisten terhadap ampisilin dapat dibedakan dari bakteri kekurangan gen selama pertumbuhannya dalam lingkungan yang mengandung anti biotik sebagai suatu bahan penyeleksi. Seleksi gen memerlukan ekspresinya dibawah kondisi yang tepat, dapat diamati pada tingkat fenotip.

Semua keanekaragaman yang terjadi dengan berbagai proses yang begitu rumit dan lengkap tidak terjadi semata-mata secara kebetulan. Semua itu terencana secara rapi dan terperinci. Setiap gen-gen mengatur aktifitas kimiawi dalam sel yang melahirkan pertukaran-pertukaran zat dan energi sesuai kode yang tepat. Aktifitas semacam ini sangat besar jumlahnya, terutama yang menyangkut reproduksi bakteri.

Sebuah bakteri baru dapat dibentuk dari substansi bakteri itu sendiri dalam waktu singkat, mengikuti informasi yang diterima dari gen-gen yang tercatat didalam pita DNA. Setiap terjadi pembagian diri, gen dibuat duplikatnya secara menyeluruh dalam organisme yang baru. Fungsi-fungsi kimiawi bakteri pada kenyataannya sangat banyak, misalnya *E. coli* dapat memproduksi tiga ribu jenis protein. Semua itu merupakan modifikasi Allah yang memiliki teka-teki dan mellihatkan kebesaran Allah SWT.

Dalam hubungan ini, kita akan percaya pada Allah SWT lebih rela untuk mengemukakan adanya campur tangan dari kemampuan-Nya untuk mencipta. Ilmu sendiri didapatkan untuk membuktikan kekuasaan Allah SWT itu nyata dan dapat kita lihat di sekeliling kita melalui apa saja termasuk alam ini. Nabi sendiri memerintahkan untuk “mencari ilmu sejak dari buaian hingga ke liang kubur”. Hal ini bertujuan untuk agar manusia mengerti bahwa banyak Al-Qur’an mendorong manusia agar mencari tanda-tanda kekuasaan Allah SWT melalui perenungan maupun fenomena alam.

Di dalam Al Quran, Allah SWT menyiratkan akan penciptaan makhluk hidup termasuk penciptaan mikroorganisme yang merupakan bagian dari makhluk hidup ciptaan Allah SWT. Proses penciptaan dan komponen penyusun makhluk hidup termasuk mikroorganisme terdapat dalam surat An-Nur ayat 45, An-Nahl ayat 12 dan An-Anbiya ayat 30.

وَاللَّهُ خَلَقَ كُلَّ دَابَّةٍ مِّن مَّاءٍ فَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى بَطْنِهِۦ وَمِنْهُمْ مَّن

يَمْشِي عَلَى رِجْلَيْنِ وَمِنْهُمْ مَّن يَمْشِي عَلَى أَرْبَعٍ يَخْلُقُ اللَّهُ مَا يَشَاءُ إِنَّ

اللَّهُ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ ﴿٤٥﴾

"Dan Allah telah menciptakan semua jenis hewan dari air, maka sebagian dari hewan itu ada yang berjalan di atas perutnya dan sebagian berjalan dengan dua kaki sedang sebagian (yang lain) berjalan dengan empat kaki. Allah menciptakan apa yang dikehendaki-Nya, sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu (Q.S An Nur: 45)"

وَسَخَّرَ لَكُمُ اللَّيْلَ وَالنَّهَارَ وَالشَّمْسَ وَالْقَمَرَ وَالنُّجُومَ مُسَخَّرَاتٌ بِأَمْرِهِ
إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿١٢﴾

"Dan Dia menundukkan malam dan siang, matahari dan bulan untukmu. Dan bintang-bintang itu ditundukkan (untukmu) dengan perintah-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memahami (nya) (Q.S An Nahl:12)"

أَوَلَمْ يَرِ الَّذِينَ كَفَرُوا أَنَّ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ كَانَتَا رَتْقًا فَفَتَقْنَاهُمَا
وَجَعَلْنَا مِنَ الْمَاءِ كُلَّ شَيْءٍ حَيٍّ أَفَلَا يُؤْمِنُونَ ﴿٣٠﴾

"Tidakkah orang-orang kafir itu melihat kelangit dan bumi disatukan, kemudian mereka Kami pisahkan dan Kami menjadikan setiap yang hidup dari air. Lantas akankah mereka tak beriman? (Q.S Al-Anbiya: 30)"

Dari beberapa ayat diatas dapat kita ketahui bahwa Allah SWT telah menciptakan makhluk hidup termasuk mikroorganisme secara sempurna atau secara mendetail tanpa ada hal yang tertinggal atau kurang pada diri makhluk hidup tersebut termasuk mikroorganisme. Sehingga kita sebagai makhluk hidup harus bersyukur dengan pemberian Allah SWT, termasuk penciptaan mikroorganisme yang banyak memberi manfaat kepada manusia. Begitu dahsyatnya Allah menciptakan makhluk hidup di dunia ini.

2.2 Enzim α -Amilase

Enzim α -amilase (*α -1,4-glucanglucanohydrolase*) adalah enzim ekstraseluler yang menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik secara acak pada rantai amilosa dan membentuk unit maltosa, dimana α -amilase memiliki berat molekul \pm 50 KDa (Balkan, 2005). α -Amilase atau *α -1,4-glucan-4glucanglucanohydrolase*, EC 3.2.1.1 termasuk keluarga endo-amilase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan glikosidik pada pati dan karbohidrat lain menghasilkan malto-oligosakarida dan glukosa dalam bentuk α -anomeric (Aiyer, 2005).

α -Amilase dapat diisolasi dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Mikroorganisme dinilai lebih ekonomis, karena dapat menghasilkan enzim dalam waktu yang pendek, tidak bergantung musim dan kondisi reaksi seperti pH dan temperatur mudah diatur (Harsono, 2001). Mikroorganisme yang banyak menghasilkan α -amilase adalah jamur dan bakteri.

Jamur banyak digunakan sebagai penghasil α -amilase karena mempunyai kelebihan diantaranya α -amilase yang dihasilkan dari jamur lebih stabil jika dibandingkan α -amilase yang dihasilkan dari bakteri sehingga lebih menguntungkan jika digunakan untuk kepentingan industri (Suganthi., dkk., 2011). Salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan α -amilase diantaranya dari genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephtalosparium*, *Mucor*, *Neurospora*, dan *Rhizopus* (Afifi *et.al.*, 2008). Enzim α -amilase yang dihasilkan oleh cendawan umumnya bersifat asam dan tidak tahan panas (termolabil) seperti pada kelompok *Aspergillus*, *Penicillium*, *Candida*, dan *Rhizopus* (Vihinen & Mantsala 1989).

2.3 Gen Penyandi α -Amilase pada *Penicillium*

Gen penyandi α -amilase dari jamur *Penicillium* memiliki perbedaan panjang basa dan urutan nukleotida (Gambar 2.1 dan 2.2). Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Bravo-Ruis (2017), diketahui bahwa panjang basa pada jamur *Penicillium sp.* 'occitanis' yang dihasilkan sebesar 1840 pasang basa (pb). Adapun penelitian Ballester dkk (2015) memperoleh gen α -amilase dari *Penicillium expansum* yaitu sebesar 2027 pb.

```
CTAACAAGGATGTCCGTTCTCAAGTAGCTTGGCAGCAGGGTACAACACGCTGGGCCATCCAC
TAGCCATTGGCACGGAGACATCACCAGTGTGCGTAACAGTGATGTTTGTGCAGGTGATCAAC
TCGGTAATGACCTGTCCGGCGGTAAAGCCCGTTCCGGAGATTGTCAAGCTGTAAGAGCTGGC
GTCTGCACCGGAGTTTGAGAGTACGGTGACGACCTGGCTGTCGTTGCTGCCTTTGCGGATGG
CGAGGTGTTGCTATCTTGGTAGATTGGGGAAGACTGAAATCGCTGTTAGGCACTGGCTCTC
CCAATGTAGGGAGATACGATGCATACCTTGTAAGTAGTGTATCCTGTGTCCAATTGAAGAGC
ATAGTTTCGGATCTTGTTGAGCTTCGAAATCCATTGGTAAAGCTCAGCGGAAGTATCAAACC
CATTC AACCAAACGGCTTCACGGTTATTAGGAACGCTGCCACCATAATGTTGTTCTGA
CCGGCATAGATAATCGGGATACCGTCCGACAAGATCGTGAAAGCAATGACGTTCTTGGCGAG
CGAAAAGTCCGAGGTGTAGTTGGCGAATCGCGGGTTGTCGTGGTTCTCGGAAAAGGAGCCTA
GCAAGGTTGAGTCATTGCAGTCGGACTTGACGGTGTGACCATGTTGTATAGATCAGAGATA
CTACCGCTGGTGCTTTCAAAGGCGCGAACGAGTGGGTAATATACTGGGTAGTTCAGGACCCC
GTCGAGGTAGTTCTGGTAAGGGCATGCAATGGTTGCGTCGCCATTGTCGACTTCGCCAACGC
AGTAGACGCCAGCTGCGCTGACCCAGGAAGGCCAAAAGTCTTTTGCAGTTCTAGAGCGGAG
TCAAGACGGAGACCGTCGACTTTACAATTCATTAGCATCGGGGGTCTTCCGATGGTAAGTTC
AAGGAAATGAGCAGCACTTACTGGAGTAGTTTGAGACCAATCCGGAATCCAGCTGTACCAC
ATGTTCTGCACATCAGTACTCTCGGTATCGAGATCTGGAAGTGAGACAATAGTGTGCGCTTC
CCAGCACTCTTCAACCATGGTCAAGTTGGAGTAATCAGTGATTTTCGCAGTAAGCATGGAAAT
AGTCTTGGCTGTTGAAAGGAGTGAAAACAGTAGTCTACGTCTGGACCGGCACCGGCGTAA
CCCTTTTGACAAAAGATAAGTTTGATTGACTACCGACAAAAAATTTGGAGGTAGACTTACCA
TGTGGTTTGGCACGACGTCAACCATGAGGTACATATCACGAGCATGGAGAGCTGTAGCCAAA
GCTTTCAGTCTTTCGGCGGCACCGTAGTTTCGAATTGATAGAGTAAGTGTTCGACGTCAGT
CCCAGTTTGAAGAGCAGTCAAATGTCAGACGTGCATGTCTGTTGCCAGTAGCCGTGATAAG
CCTCTCCATCTGCAGTAGATTGATTCAACTGCTCAGTAACAGGAGTAATCCAGATGGCCGTG
AATCCCATGTTCTGGATATAATCCAACGTACAGATCGTTTTAGTTTTGTCAATACTTTAAG
AGCCCGACCGTTGTACTCGACGTACCTGGTTGATGATTCCCTGCCATGATCCTCCGCAGTAT
TGCTATGAAGAGTTAGTTTACATAAGTGGACTTCCAAGTCACACAACATTCAAAACTTACGC
CTAACGCAGAATCGCACTCTGCAGTGGTGAATTGTCCGTTTCGAGAGAATCGATCCGTGAGA
AGAAAAGTAAATAGATCGTGAGCGCCATTATCCGGAGTAGCAGCTTCAGCAACCTGTGCTAG
AAGACCTGCAACTGCAGCGCTTGCGATGAGCGACAGCTTCAT
```

Gambar 2.1 Urutan gen penyandi α -amilase pada *Penicillium sp.* 'occitanis' strain CL100 contig_433, whole genome shotgun sequence 1840 pb (Bravo-Ruis, dkk., 2017).

ATGGTTCTCGCACGATTTGCTTGGCTTACCAGCTTGGTTGGCACTGCCATTGCTGCCACTCCAGCT
 GAATGGCGATCGCAGTCGATCTACTTCATGCTCACTGATCGCTTTCGCGAACGGATGGCTCGACT
 ACTGCTGCTTGGGATACCAGTGATAGAGTAAGCTGCTGTTTATGTATCGACTCTATGACATGAAGA
 TAGAGCTAACTGTACTTGTGTTGATAGAAATACTGCGGTGGAACCTGGCAAGGAATCATAGATAAGG
 TCAGTAACGCTCTAATCCTTCATATATCACACAACCTGACCAATCCTTAGCTGGACTACATCCAAGG
 AATGGGCTTCACGGCAATTTGGATCACCCCTGTAACCGGTCAATTAACGAGGACACCCCATACGGG
 GATCCCTATCATGGGTACTGGCAGCAGGACATGTGAGTATCGCAAAGCAGAAAAAGACAACCCCTTCA
 ACTCTGCATGCTTACTGACCAATATTAAGCTATGCCCTCGACTCAAACTACGGACTGCAGACGATC
 TTAAGGCCCTCGCTGCGGCTTTGCACAAACGCGACATGTATCTCATGGTCGATGTAGAGCAAACCA
 CATGGTAAGTCAACTCATCCGAATCATCCCCGATAATCCAGGTTGAGACTGACATGTATGGATAAA
 AAGGGCTACGACGGCGCAGGTGCTGACGTAGACTACACCAAATTCACCCCTTCAACGATGCAAAG
 TATTTCCACTCCTACTGCCAATCACCGATTACAGCGATGACACCATGGCGCAAACTGCTGGCTT
 GGCGACAATAAGGTCTCACTGCCAGATCTGGATACACAGAGCACAGAGGTGCAGGATATTTGGTAT
 GACTGGGTGGATCTTTGGTCTCCAACCTACTCCAGTAAGTTGTTTTCTCTCAAATTCACCCCTTAG
 CAAGATATATCGCCATATCTAGAGACTGACCAATGTATAGTCGACGGCCTCCGCATTGACACAGTC
 AAACATGTCCAGAAAGATTTCTGGCCCCGTTACAACAAGGCCGCGGGCGTCTACTGCGTAGGCGAG
 GTCTTTGATGGAGACGTCGATTATACCTGTCCATACCAGGAGGTAATGGACGGAGTGCTTAACCTAC
 CCAATGTGAGATCCAGCTTATACATGGAATGTACCAGATACACAGGGAGAACTAAAAATAATGAAC
 TGAAATAGCTACTACCCCTCCTCAAAGCCTTCCAATCGACCTCGGGAAGCATGACCGACCTATAC
 AACATGATCAACACGGTGAAATCGACCTGCAAAGATTCAACCCCTTCTCGGGACCTTCCTAGAGAAC
 CATGATAACCCACGTTTTGCTCGTAAGTGGAATTCATAAAAGCAACGGGCATAATTCCACTCT
 GTATATCTAAAACTGACATCTCTCCCTTGGGAACCCAGAGTCACCAACGACATTGCCCTCGCCAAG
 AACGCAGCCACATTCACTATCATGGCAGACGGTATTCCCTATCGTCTACGCAGGACAGGAGCAGCAC
 TATAGTGGCGGCGAGGACCCAGCTAATCGTGAGGCTCTGTGGCTGTCTGGATACAACACGGACAGC
 GAGCTGTACAAGCTCATTGCGACGGCCAATGGTGCTAGAAAATCAGGCGATTGCAAAGAGTACCAAC
 TATACTATTTACCAGGTATGTGCTTGTCTCTGTCTCAAGTGAATGAAGAAAGGAAGGACAGAAA
 AAATAACTCCGTCTTCACAGAACTACCCAATCTACAAAGACGACAGCACCATTGCCATGCGGAAG
 GGCTATGATGGTGGGCAGACAATTACCATCCTAACGAATCTCGGCGCAGGAGGTAAAGAGTACTCG
 GTTTCGATTCTCTGGTACTGGATTGCGAGCTGGTGCGAAGTTGACAGAGGTTGTCTCTGCGCCAGC
 GTTACTGCTGGTGAGAGTGGGGAGGTGTCTGTTCCCTATGGCTGGTGAGCTCCGAGAATTTTGGTC
 CCACCTCTTTGCTTGAGGGCTCGACTCTCTGCTCGTCGTAG

Gambar 2.2 Urutan gen penyandi α -amilase dari *Penicillium expansum* strain MD-8 chromosome Unknown contig348, whole genome shotgun sequence 2027 pb (Ballester, dkk., 2015).

2.4 Asam Amino dan Struktur Enzim α -Amilase

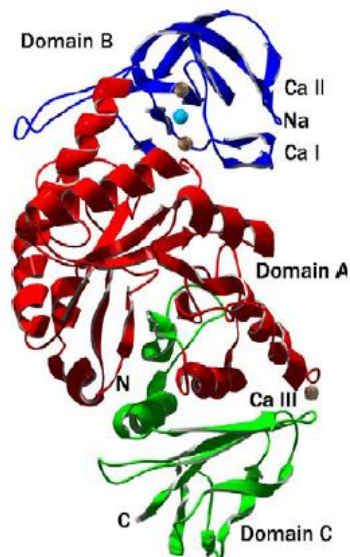
Enzim α -amilase dikode oleh gen penyandi gen α -amilase dimana enzim α -amilase tersusun atas jumlah asam amino yang bervariasi. Hasil penelitian dilakukan oleh Yanchen (2015) berhasil mendapatkan asam amino α -amilase berjumlah 495 asam amino pada jamur *Penicillium* sp. (Gambar 2.3).

Struktur 3 dimensi enzim α -amilase memiliki 3 domain utama, yaitu domain A, B, dan C (Gambar 2.4). Domain A merupakan domain $(\beta/\alpha)_8$ -barrel yang ditunjukkan oleh warna merah yang merupakan domain yang paling lestari dari α -amilase. Domain B menyisip secara tidak beraturan diantara rantai β sheet

ke tiga dan rantai α heliks dari $(\beta/\alpha)_8$ -barrel, domain ini ditunjukkan oleh warna biru dan dikenal sebagai *prosthion* dari domain A.

```
MVLARLAWLAGLVSTAIAATPAEWRSSQSIYFMLTDRFARTDGGSTTAACDT
ADRKYCGGTWQGIIDKLDYIQGMGFTAIWITPVTGQLSGETAYGDYHGY
WQQDIYSLDSNYGTAGDLKALAAALHKRNMVLMVDVANHMGYNGAGADV
DYTKFNPFNKAKYFHSYCPITDYNDDTMSQNCWLGNKVS L PDLNTQSKE
VQDLWYDWVGSLSVSNYSIDGLRVDTVKHVQKDFWPGYNKAAGVYCVGEIL
DGDPDYTCPYQEVMDGVLNYPYIYPLLKAFQSTSGSMTDLYNMINTVKST
CKDSTLLGNFLENHDNPRFAHATDDIALAKNAATFTIMADGIPIVYAGQE
QHCSGGEDPANREALWLSGYNTDSELYKLIKANGARNQAIKSTNYTIY
QNHPIYKDESTIAMRKGFDDGGQTITVLTNLGAGGKEYSVSIPDTGFKAGA
KLTEVVSCTSVTVGDSGEVSVPMAGGAPKILLPTPLLEGSA LCSS
```

Gambar 2.3 Urutan asam amino α -amilase *Penicillium* sp. AIF73124.1 (Yanchen, 2015).

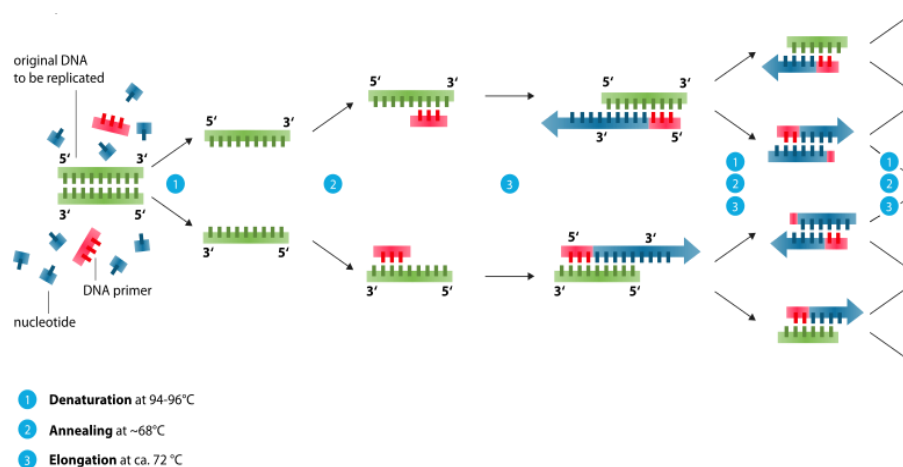


Gambar 2.4 Struktur 3 dimensi α -amilase (Rosahdi, 2008)

2.5 Polymer Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode molekuler untuk penggandaan DNA secara *in vitro* menggunakan enzim dan sepasang primer yang

bersifat spesifik terhadap DNA target. Dengan metode ini, segmen tertentu pada DNA dapat digandakan hingga jutaan kali lipat dalam waktu relatif singkat (Singleton, 2000). Metode ini terdiri dari tiga tahapan utama yaitu tahap denaturasi, penempelan primer (*annealing*), dan elongasi atau pemanjangan primer (Gambar 2.5). Metode PCR memerlukan berbagai komponen yaitu DNA templat, sepasang primer, DNA polimerase, ion Mg^{2+} , dNTP, dan bufer.



Gambar 2.5 Tiga tahapan utama pada *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Brown, 2010).

2.6 Templat DNA

Templat DNA adalah rantai DNA yang mengkode atau mencetak rantai mRNA (kodon) yang memiliki untaian DNA dengan arah 3'→5'. Untaian ini disebut sebagai untaian (-) dan berperan untuk melakukan transkripsi membentuk mRNA. (Yuwono, 2009). Ukuran target amplifikasi biasanya kurang dari 1000 pasangan basa (bp) atau 1 kb dengan hasil amplifikasi yang efisien antara 100-400 pb. Meskipun, hasil amplifikasi lebih dari 1 kb dimungkinkan prosesnya kurang efisien. Hal tersebut dikarenakan produk yang panjang cenderung rentan terhadap

inhibitor yang dapat mempengaruhi kerja enzim DNA polymerase dan waktu yang diperlukan lebih lama. Hal ini dapat menyebabkan hasil amplifikasi tidak maksimal.

2.7 Desain Primer

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan pemeriksaan PCR adalah ketepatan susunan primer PCR yang digunakan karena akan menentukan sensitifitas dan spesifitas pemeriksaan. Primer PCR merupakan potongan pendek DNA untai tunggal (biasanya 18-30 pp) yang terdiri dari *forward primer* (F) dan *reverse primer* (R). Primer digunakan untuk inisiasi proses amplifikasi DNA dan untuk membatasi proses amplifikasi sehingga dapat ditentukan panjang produk PCR (amplikon) yang dihasilkan.

Urutan primer harus spesifik dan terletak pada daerah lestari (*conserve region*) sehingga tidak terjadi *mismatch* dan *unmatch* agar diperoleh hasil yang diinginkan. Hibridisasi dan amplifikasi harus terjadi pada urutan template DNA gen target dan tidak boleh terjadi hibridisasi dan amplifikasi pada tempat yang tidak diinginkan (bukan gen target) (Yuryev, 2007; Garibyan & Avashia, 2013).

Primer PCR didesain secara *in silico* dengan menggunakan beberapa program seperti Primer-BLAST, IDT, PerlPrimer, dan Primer3. Primer PCR juga dapat didesain secara manual dengan tetap memperhatikan beberapa ketentuan yang berlaku. Penggunaan program komputer dapat mempermudah perancangan primer secara cepat sesuai dengan kebutuhan (Yuryev, 2007).

Syarat \ primer yang baik dan tepat diantaranya panjang basa dan suhu leleh (*melting point* atau T_m). Primer umumnya memiliki panjang basa 18-30 pb

dengan tidak memiliki selisih suhu leleh yang terlalu tinggi. Suhu leleh primer yang digunakan harus sama untuk memastikan kinerja yang konsisten pada pasangan primer. Perbedaan T_m sepasang primer sebaiknya tidak lebih dari 5°C . Suhu primer *annealing* harus stabil agar produk PCR lebih efisien.

Parameter lain yang perlu diperhatikan adalah persen GC. Primer disarankan memiliki persen G dan C dengan rentang 40-60%, memiliki basa GC pada ujung yang dapat membuat hibridisasi lebih stabil, dan tidak mengandung *secondary structures* berupa hairpin atau dimer. Primer sebaiknya tidak memiliki urutan pengulangan dari 2 basa dengan toleransi pengulangan sebanyak 4 kali, semisalnya ATATATAT. Primer sebaiknya tidak memiliki urutan basa yang diulang terus menerus seperti urutan 5'-AGCGGGGGATGGGG dengan basa G diulang sebanyak 5 kali berturut-turut. Panjang PCR produk yang ideal berkisar antara 100-500 pasang basa.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang **dimulai sejak bulan November sampai Mei 2020.**

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pengamatan morfologi secara mikroskopik adalah mikroskopo dan kaca preparat, Desain primer menggunakan perangkat keras berupa Laptop DELL Inspiron 14 3000 Series.

3.2.2 Bahan

Sampel isolat jamur *Penicillium sp.* hasil isolasi dari batu bara yang diambil dari PLTU Paiton Probolinggo. Semua gen α -amilase diperoleh dari genbank, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/. Perancangan primer menggunakan program *primer designing tool* dari NCBI (National Center for Biotechnology Information), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

3.3. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Pengamatan morfologi
2. Penentuan template DNA
3. Desain primer gen α -amilase
4. Analisis Data

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan secara makroskopik dengan mengamati koloni yaitu meliputi pengamatan bentuk, warna, tekstur, tepian, dan elevasi koloni jamur. Pengamatan mikroskopik juga dilakukan yang meliputi pengamatan bentuk sel, bentuk hifa atau miselium, bentuk spora, dan ada tidaknya sekat pada hifa.

3.4.2 Penentuan Templat DNA

Urutan DNA gen α -amilase dari berbagai spesies *Penicillium* diunduh di NCBI. Pada database tersebut berisi gen α -amilase dalam bentuk gen parsial atau gen lengkap. Pengunduhan gen α -amilase dalam bentuk fasta (.txt). Cara pengunduhan dengan prosedur sebagai berikut:

Buka program NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, pada database dipilih “gene”, kemudian sekuen diinput “alpha amylase gene of *Penicillium*” pada kolom “search” lalu diklik search, diambil seluruh sekuen gen α -amilase jamur *Penicillium* yang ada pada database. Selanjutnya, klik sekuen tersebut, lalu pada

kolom GenPept dipilih “FASTA (text)”, klik “Apply”. Setelah itu, disalin sekuen tersebut ke dalam aplikasi *Notepad*, klik “File” lalu klik “Save as”. Beri nama file tersebut, ex: “alpha amylase gene of *Penicillium* 1”, lakukan hal yang sama pada sekuen α -amilase yang lain.

Gen sudah terkumpul dianalisis kembali untuk mendapatkan gen lengkap α -amilase. Gen α -amilase yang memiliki tingkat kesamaan yang tinggi antara sesama gen α -amilase dijadikan parameter pemilihan gen tersebut sebagai templat. Selain itu, pemilihan templat juga didasarkan pada panjang gen α -amilase yang diperoleh.

3.4.3 Desain primer

Program BLAST “ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/” dibuka dan salin “gen α -amilase” yang akan dijadikan template pada bagian “Enter accession,gi, or FASTA sequence” dan klik “Get Primers”, software akan membaca primer yang dibutuhkan.

The screenshot shows the NCBI Primer-BLAST web interface. The main heading is "Primer-BLAST" with the subtitle "A tool for finding specific primers". Below this, it says "Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST)". The interface is divided into several sections:

- PCR Template:** Contains a text input field for "Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred)", a "Clear" button, and a "Range" selector with "From" and "To" fields. There are also fields for "Forward primer" and "Reverse primer".
- Or, upload FASTA file:** Includes a "Choose File" button and a "No file chosen" status.
- Primer Parameters:**
 - Options to "Use my own forward primer (5'→3' on plus strand)" and "Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand)", each with a "Clear" button.
 - Input fields for "PCR product size" (Min: 70, Max: 1000).
 - A dropdown for "# of primers to return" set to 10.
 - Input fields for "Primer melting temperatures (Tm)" (Min: 57.0, Opt: 60.0, Max: 63.0, Max Tm difference: 3).
- Exon/intron selection:**
 - A note: "A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section".
 - A dropdown for "Exon junction span" set to "No preference".
 - Input fields for "Exon junction match" (Min 5' match: 7, Min 3' match: 4, Max 3' match: 8).
 - A note: "Minimal and maximal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction".

Gambar 3.1 Halaman depan Primer-BLAST

3.4.4 Analisis Data

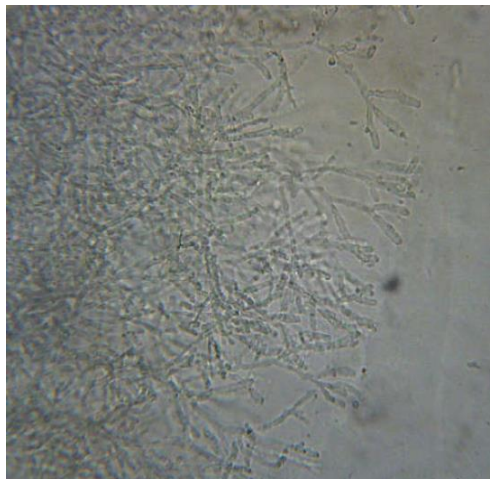
Data yang diperoleh dari perancangan primer berupa sepuluh pasangan primer dengan menampilkan karakteristik berupa panjang produk, suhu leleh/melting temperatur (T_m) dan persen GC. Dari sepuluh pasang primer akan dipilih tiga jenis primer dengan mempertimbangkan posisi penempelan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Morfologi Jamur *Penicillium sp.*

Penelitian sebelumnya telah melakukan pengamatan morfologi jamur yang terdiri dari bentuk koloni, warna koloni. Pada penelitian sebelumnya telah didapatkan isolat yang diberi nama A BTBR, dimana pada pengamatan dibawah alat mikroskop menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki bentuk koloni bulat, dengan tepian rata, dan permukaan yang bergelombang, bagian atas isolat jamur memiliki warna putih, sedangkan bagian bawah koloni berwarna keabu-abuan. Koloni A BTBR hasil isolasi pada penelitian sebelumnya ditunjukkan pada **Gambar 4.1**.



Gambar 4.1 Hasil pengamatan morfologi isolat A BTBR menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40X (Khoir, 2018)

Hasil pengamatan yang dilakukan telah menunjukkan jamur membentuk cabang pada ujung hifa. Pada cabang akan tumbuh lagi menjadi jamur baru, Cabang tersebut berwarna kehijauan. Isolat jamur A BTBR adalah genus

Penicillium sublateritium berdasarkan analisis genotip menggunakan gen 18 rRNA. Jamur *P. sublateritium* memiliki kemampuan untuk menghasilkan amilase, dimana penelitian selanjutnya yaitu, isolasi gen amilase pada jamur *P. sublateritium* dengan mendesain primer gen amilase terlebih dahulu.

4.2 Penentuan Templat DNA

DNA *template* atau cetakan yang digunakan sebagai acuan pada desain primer adalah sekuen gen dari *Penicillium sp.* yang terdapat di dalam *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pada tahap penelitian ini gen pada jamur *Penicillium* didapatkan data sebanyak 16 gen, dimana masing-masing data gen yang dihasilkan yaitu dengan data gen penuh dan data gen setengah.

Tabel 4.1 Data Gen amilase dari berbagai jenis spesies *Penicillium*

No	Nomor Akses	Jenis <i>Penicillium</i>	Panjang basa α -amilase	Referensi
1.	NW_015971310	<i>P. expansum</i>	2027 bp	Ballester, dkk., 2015
2.	NW_015971428	<i>P. expansum</i>	2482 bp	Ballester, dkk., 2015
3.	NW_015971418	<i>P. expansum</i>	1964 bp	Ballester, dkk., 2015
4.	NW_015971304	<i>P. expansum</i>	2054 bp	Ballester, dkk., 2015
5.	LHQR01000065	<i>P. griseofulvum</i>	2448 bp	Banani & Davide, 2016
6.	LHQR01000070	<i>P. griseofulvum</i>	1703 bp	Banani & Davide., 2016
7.	NPFK01000092	<i>P. Sp. 'occitanis'</i>	1729 bp	Bravo-Ruis, dkk., 2017
8.	NPFK01000226	<i>P. Sp. 'occitanis'</i>	2319 bp	Bravo-Ruis, dkk., 2017
9.	NPFK01000433	<i>P. Sp. 'occitanis'</i>	1840 bp	Bravo-Ruis, dkk., 2017

Data yang dihasilkan diperoleh dari beberapa jenis jamur *Penicillium* dengan panjang basa yang beragam yang ditunjukkan pada (**Tabel 4.1**). Urutan α -amilase secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Dari 16 data gen yang diperoleh hanya akan diambil gen penuh saja yang bertujuan untuk mendapatkan DNA template yang digunakan untuk desain primer pada tahap selanjutnya.

Data sekuen berasal dari 3 jenis *Penicillium* dengan jumlah sekuen sebanyak 9 data dengan panjang basa yang berbeda yaitu pada jamur *P. expansum*, *P. griseofulvum*, dan *Penicillium sp. 'occitanis'*. Ketiga spesies jamur memiliki panjang basa dari 1703 bp sampai dengan 2482 bp. Masing-masing sekuen dapat digunakan sebagai acuan pada templat DNA.

Pemilihan *template* dilakukan berdasarkan analisis terhadap panjang basa pada masing-masing *Penicillium* dan jenis *Penicillium* yang akan digunakan, yaitu *P. expansum*, *P. griseofulvum*, dan *Penicillium sp. 'occitanis'*. Pada *Penicillium expansum* memiliki panjang basa dengan rentang antara 1964 bp sampai 2482 bp, jenis *Penicillium griseofulvum* memiliki panjang basa dengan rentang antara 1703 bp sampai 2442 bp, sedangkan pada *Penicillium sp. 'occitanis'* memiliki panjang basa dengan rentang antara 1729 bp sampai dengan 2319 bp. Masing-masing sekuen dengan rentang panjang basa yang berbeda dipilih berdasarkan jumlah panjang basa yang berada di tengah-tengah antara panjang sekuen terbesar dan yang terkecil dengan tujuan untuk mewakili proses *alignment*, yaitu sekuen dari *Penicillium expansum* dengan panjang basa 2027 bp, *Penicillium griseofulvum* dengan panjang basa 1703 bp, dan *Penicillium sp. 'occitanis'* dengan panjang basa 1840 bp.

Hasil sekuen yang telah dipilih, yaitu 3 spesies dengan panjang basa yang berbeda. Sekuen hasil *alignment* telah dilampirkan pada **Lampiran 1**. Pemilihan primer didasarkan pada sekuen yang memiliki kemiripan tertinggi diantara 2 sekuen lainnya. Hasil *alignment* menunjukkan bahwa *Penicillium sp. 'occitanis'* dengan panjang basa 1840 bp memiliki similaritas yang tinggi, sehingga sekuen *Penicillium sp. 'occitanis'* dapat dijadikan sebagai *template*.

```
CTAACAAGGATGTCCGTTCTCAAGTAGCTTGGCAGCAGGGTACAACACGCTGGGCCATCCAC
TAGCCATTGGCACGGAGACATCACCAGTGTGCTAACAGTGATGTTTGTGCAGGTGATCAAC
TCGGTAATGACCTGTCCGGCGGTAAAGCCCGTTCCGGAGATTGTCAAGCTGTAAGAGCTGGC
GTCTGCACCGGAGTTTGAGAGTACGGTGACGACCTGGCTGTGCTTGCCTTTGCGGATGG
CGAGGTTGTTGCTATCTTGGTAGATTGGGGAAGACTGAAATCGCTGTTAGGCACTGGCTCTC
CCAATGTAGGGAGATACGATGCATACCTTGTAAGTAGTGTATCCTGTGTCCAATTGAAGAGC
ATAGTTTTCGGATCTTGTGAGCTTCGAAATCCATTGGTAAAGCTCAGCGGAAGTATCAAACC
CATTCAACCAAACGGCTTCACGGTTATTAGGAACGCTGCCACCACTATAATGTTGTTCTCTGA
CCGGCATAGATAATCGGGATACCGTCCGACAAGATCGTGAAAGCAATGACGTTCTTGCGGAG
CGAAAAGTCCGAGGTGTAGTTGGCGAATCGCGGGTTGTGCTGGTTCTCGGAAAAGGAGCCTA
GCAAGGTTGAGTCATTGCAGTCGGACTTGACGGTGTGACCATTGTTGTATAGATCAGAGATA
CTACCGCTGGTGCTTTCAAAGGCGCAACGAGTGGGTAATATACTGGGTAGTTCAGGACCCC
GTCGAGGTAGTTCTGGTAAGGGCATGCAATGGTTGCGTGCCTATTGTCGACTTCGCCAACGC
AGTAGACGCCAGCTGCGCTGACCCAGGAAGGCCAAAAGTCTTTTTGCACTTCTAGAGCGGAG
TCAAGACGGAGACCGTTCGACTTTTACAATTCAATTAGCATCGGGGGTCTTCCGATGGTAAGTTC
AAGGAAATGAGCAGCACTTACTGGAGTAGTTTGAGACCAATTCCGGAATCCAGCTGTACCAC
ATGTTCTGCACATCAGTACTCTCGGTATCGAGATCTGGAAGTGAGACAATAGTGTGCGCTTC
CCAGCACTCTTCAACCATGGTCAAGTTGGAGTAATCAGTGATTTTCGCAGTAAGCATGGAAAT
AGTCTTGGCTGTTGAAAGGAGTGAAAACAGTAGTCTACGTCTGGACCGGCACCGGCGTAA
CCCTTTTGACAAAAGATAAGTTTGATTGACTACCGACAAAAAATTTGGAGGTAGACTTACCA
TGTGGTTTGCCACGACGTCAACCATGAGGTACATATCACGAGCATGGAGAGCTGTAGCCAAA
GCTTTCAAGTCTTCGGCGGCACCGTAGTTTCAATTGATAGAGTAAGTGTTCGACGTCAGT
CCCAGTTTGAAGAGCAGTCAAATGTCAGACGTGCATGTCCTGTTGCCAGTAGCCGTGATAAG
CCTCTCCATCTGCAGTAGATTGATTCAACTGCTCAGTAACAGGAGTAATCCAGATGGCCGTG
AATCCCATGTTCTGGATATAATCCAAGTGTACAGATCGTTTTAGTTTTGTCAATACTTTAAG
AGCCCGACCGTTGTACTCGACGTACCTGGTTGATGATTCCCTGCCATGATCCTCCGCAGTAT
TGCTATGAAGAGTTAGTTTACATAAGTGGACTTCCAAGTCACACAACATTCAAACTTACGC
CTAACGCAGAATCGCACTCTGCAGTGGTCAATTGTCCGTTTCGAGAGAATCGATCCGTGAGA
AGAAAGTAAATAGATCGTGAGCGCCATTATCCGGAGTAGCAGCTTCAGCAACCTGTGCTAG
AAGACCTGCAACTGCAGCGCTTGCATGAGCGACAGCTTCAT
```

Gambar 4.2 Urutan nukleotida gen penyandi α -amilase pada jamur *Penicillium sp. 'ocitanis'*, sekuen penuh dengan panjang 1840 bp (Bravo-Ruis, et al., 2017)

4.3 Desain Primer

Desain primer merupakan rancangan dari sebuah primer yang akan digunakan untuk proses penggandaan DNA pada metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Salah satu faktor keberhasilan pemeriksaan PCR adalah ketepatan susunan primer PCR untuk menentukan sensitifitas dan spesifisitas pemeriksaan. Pada penelitian ini dilakukan proses desain primer dengan metode *in silico* dengan menggunakan *software primer designing tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), yaitu primer-BLAST dari NCBI.

Tabel 4.2 Hasil Desain Primer *Penicillium sp. 'occitanis'* strain CL100 contig_433 (NPFK01000433)

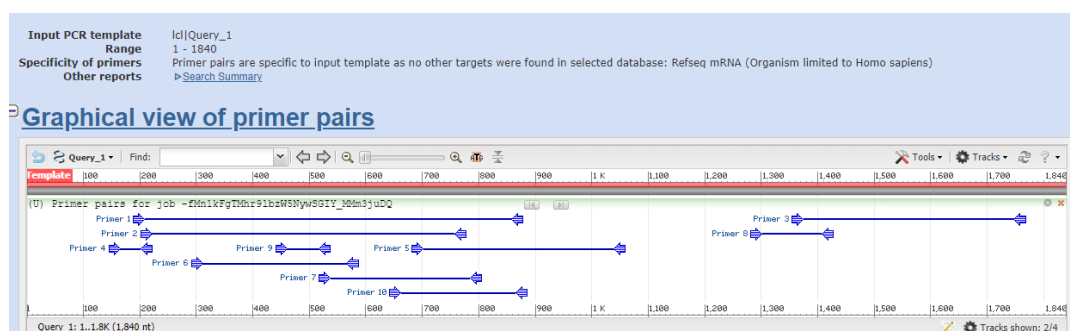
No	Pasang Primer	Awal	Akhir	Tm	GC%	Panjang Produk
1.	F CTGCACCGGAGTTTGAGAGT	189	208	59.97	55.0	690
	R TCCGTCTTGACTCCGCTCTA	878	859	60.04	55.0	
2.	F TGAGAGTACGGTGACGACCT	202	221	59.96	55.0	576
	R ACCATTGCATGCCCTTACCA	777	758	59.96	50.0	
3.	F CGACGTCAGTCCCAGTTTGA	1355	1374	59.97	55.0	413
	R ATGAATGGCGCTCACGATCT	1767	1748	59.89	50.0	
4.	F GTAAAGCCCGTTCCGGAGAT	146	165	59.82	55.0	76
	R AGGTCGTCACCGTACTCTCA	221	202	59.96	55.0	
5.	F ACTACCGCTGGTGCTTTCAA	682	701	59.89	50.0	378
	R GCTGGGAAGGCGACACTATT	1059	1040	60.11	55.0	
6.	F CTGTTAGGCACTGGCTCTCC	292	311	60.11	60.0	295
	R ATTCGCCAACTACACCTCGG	586	567	60.11	55.0	
7.	F CCGTCCGACAAGATCGTGAA	518	537	60.11	55.0	287
	R GTTGGCGAAGTCGACAATGG	804	785	59.83	55.0	
8.	F GCATGGAGAGCTGTAGCCAA	1282	1301	60.11	55.0	146
	R GCTTATCACGGCTACTGGCA	1427	1408	60.18	55.0	
9.	F ACCAAACGGCTTCACGGTTA	441	460	60.18	50.0	97
	R TTCACGATCTTGTCGGACGG	357	518	60.11	55.0	
10.	F GGACTTGACGGTGTGACCA	643	662	60.18	55.0	243
	R GACGGTCTCCGTCTTGACTC	885	866	59.83	60.0	

Hasil desain primer dengan templat *Penicillium sp. 'occitanis'* strain CL100 contig_433 (NPFK01000433) memberikan rekomendasi primer sebanyak 10 pasang primer yang ditunjukkan pada **Tabel 4.2**. Panjang produk memberikan variasi yang beragam dengan rentang terkecil, yaitu 76 sampai rentang terbesar 690. Informasi karakteristik masing-masing primer secara lengkap dilampirkan pada **Lampiran 3**.

Kesepuluh kandidat primer yang dihasilkan telah memenuhi standar kriteria kelayakan primer berdasarkan panjang basa primer. Semua kandidat primer memiliki panjang basa sebanyak 20 basa. Menurut Borah (2011) primer yang ideal secara umum memiliki panjang 18-30 basa nukleotida, pada panjang basa ini diharapkan dapat mengikat *template* pada suhu *annealing*. Jika primer terlalu pendek akan mengurangi spesifitas primer sehingga dapat menempel pada *template* dengan suhu *annealing* yang tidak diinginkan. Sedangkan primer yang terlalu panjang tidak akan dapat menempel pada *template* yang diinginkan (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Parameter lain yang perlu diperhatikan adalah selisih nilai T_m pada primer *forward* dan *reverse*, dan nilai %GC. Kesepuluh kandidat primer menunjukkan bahwa T_m memenuhi standar kriteria primer yang baik, yaitu 59-60,11°C. Menurut WHO (2012) T_m (*Melting Temperature*) yang optimal dari primer *forward* dan *reverse* memiliki rentang 2-4°C, diantara 50-65°C. Berdasarkan nilai %GC, 10 kandidat primer memiliki nilai %GC yang berada pada rentang 50-60%. Menurut Rudiretna (2001), presentase banyaknya Guanin dan Sitosin (%GC) dalam suatu primer sebaiknya berada pada rentang 40-60%.

Data lain yang diperoleh dari analisis primer adalah posisi penempelan kesepuluh kandidat primer (**Gambar 4.3**). Delapan dari 10 kandidat primer paling menempel pada nukleotida nomor 146 sampai 1059 yaitu primer 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, dan 10. Adapun kandidat primer 3 dan 8 menempel pada nukleotida nomor 1282 sampai 1767.



Gambar 4.3 Posisi penempelan kandidat primer pada templat *Penicillium sp. 'occitanis'* (NPFK01000433) dengan panjang basa 1840 pb.

Sepuluh kandidat pasang primer yang ada dipilih 3 pasang primer, yaitu pasang primer 1, pasang primer 2, dan modifikasi pasang primer 8 (*forward*) dan 6 (*reverse*). Pemilihan primer didasarkan pada jumlah produk yang terbentuk, yaitu primer 1 dengan panjang produk 690 pb, primer 3 dengan panjang produk 413 pb, dan modifikasi primer *forward* 6 dan primer *reverse* 8 dengan panjang produk 1116 pb (**Tabel 4.2**). Ketiga primer tersebut dipilih didasarkan pula pada posisi penempelan primer yang mewakili keseluruhan sekuens sehingga diharapkan mampu mengamplifikasi sebagian besar sekuens templat.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Tiga kandidat primer yang terpilih yang akan digunakan, yaitu

- Primer 1 (*Forward* 5'-CTGCACCGGAGTTTGAGAGT-3' dan *reverse* 5'-TCCGTCTTGACTCCGCTCTA-3'),
- Primer 3 (*forward* 5'- CGACGTCAGTCCCAGTTTGA-3' dan *reverse* 5'-ATGAATGGCGCTCACGATCT-3')
- Primer modifikasi 6-8 (*Forward* 5'-CTGTTAGGCACTGGCTCTCC-3' dan *reverse* 5'- GCTTATCACGGCTACTGGCA-3')

5.2 Saran

Ketiga kandidat primer perlu dilakukan analisis lebih lanjut untuk memastikan apakah primer yang dihasilkan tepat digunakan untuk isolas gen α -amilase dari jamur *Penicillium sp.*

DAFTAR PUSTAKA

- Aiyer, P. V. 2005. Review: Amylases and Their Applications. *African Journal of Biotechnology*, 4 (13): 1525-1529.
- Akcan, N., Fikret, U., & Aysel, G. 2011. Alpha-Amylase Production by *Bacillus subtilis* RSKK96 in Submerged Cultivation. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 17: S17-S22.
- Ballester, A. R., Marcet-Houben, M., Levin, E., Sela, N., Selma-Lazaro, C., Carmona, L., Wisniewski, M., Droby, S., Gonzalez-Candelas, L. & Gabaldon, T. 2015. Genome, Transcriptome, and Functional Analyses of *Penicillium expansum* Provide New Insights into Secondary Metabolism and Pathogenicity. *Journal Mol. Plant Microbe Interact.*, 28 (3): 232-248.
- Balkan, B., & Ertan, F. 2005. Production and Properties of Alpha Amylase from *Penicillium chrysogenum* and its Application in Starch Hydrolysis. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 35: 169-178.
- BBC. 2014. Reseach Market Forecasting. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Diakses 23 Juni 2014 dari <http://www.bccresearch.com/marketresearch/biotechnology/enzymes-industrial-applicationsmarkets-bio030g.html>.
- Borah, P. 2011. Primer Designing for PCR. *Science Vision*, 11(3): 134 -136.
- Brown, T. A. 2010. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. 6th edition. Oxford: Willey & Blackwell.
- Fogarty, W. M. 1983. *Microbial Enzyme and Biotechnology*. New York: Applied Science Publisher.
- Garibyan, L. & Avashia, N. 2013. Research techniques made simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J. Invest Dermatol.*, 133(3).
- Handoyo, D., & Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase chain Reacion (PCR). *Unitas*, 9(1): 17-29.
- Harsono, Y. 2001. Pemurnian Enzim α -Amylase dengan Menggunakan Filtrasi Gel. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Jacobs, H., & J. A. Delcour. 1998. Hidrothermal Modifications of Granular Starch, with Retention of the Granular Structure: A Review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(8): 2895-2905.

- Khoir, M. S. 2018. Identifikasi Molekuler Jamur Isolat Batubara Berdasarkan Sekuen *Internal Transcribe Spacer* (ITS). *Skripsi*. Universitas Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Miguel A. S. M., Meyer, T. S. M., Figueiredo, E. V. C., Lobo B. W. P., & Ortiz G. M. D. 2013. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. Licensee InTech. Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- Oghenetega, J. A. Akpovwehwee A. Anigborob, Nnanna N. Unachukwuc, Nyerhovwo J. Tonukarib. 2018. Isolation, Identification and in silico Analysis of alpha-Amylase Gene of *Aspergillus niger* strain CSA35 Obtained from Cassava Undergoing Spoilage. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14: 35–42.
- Poliana, J., & MacCabe, A.P. 2007. *Industrial Enzymes; Structure, Function, and Applications*. Dordrecht: Springer.
- Rosahdi, T. D. 2008. Studi Pendahuluan untuk Mendapatkan Informasi Gen Pengkode α -amilase dari Bakteri Laut Galur Lokal *Vibrio* sp. SFNB3. *Tesis*. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Singleton, P. 2000. *DNA Methods in Clinical Microbiology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Sivaramarishknan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., & Pandey, A., 2006/ Alpha Amylase Production by *Aspergillus oryzae* Employing Solid-State Fermentation, *J. Sci. Ind. Res.*, 66: 621-626.
- Suganthi, R., Benazir, J. F., Santhi, R., Kumar, R. V., Hari, A., Meenakshi, N., Nidhiya, K. A., Kavitha, G., & Lakshmi, R. 2011. Amylase Production by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Using Agroindustrial Wastes. *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)*, 1736-1739.
- Vihinen, M., & Mantsala, P. 1989. Microbial Amylolytic Enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24: 329-418.
- Yanchen Yin, Youzhi Mao, Xiaolie Yin, Bei Gao, & Dongzhi Wei. 2015. Construction of a Shuttle Vector for Heterologous Expression of a Novel Fungal α -Amylase Gene in *Aspergillus oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(7), 988–998.
- Yuryev, A. 2007. *Methods in Molecular Biology: PCR Primer Design*. New Jersey: Hummana Press.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sepuluh gen α -amilase dari berbagai spesies *Penicillium*

>NW_015971310.1 *Penicillium expansum* strain MD-8 chromosome
Unknown contig348, whole genome shotgun sequence 2027 bp

```
ATGGTTCTCGCACGATTTGCTTGGCTTACCAGCTTGGTTGGCACTGCCATTGCTGCCACT
CCAGCTGAATGGCGATCGCAGTCGATCTACTTCATGCTCACTGATCGCTTTGCGCGAACG
GATGGCTCGACTACTGCTGCTTGGCATAACCAGTGATAGAGTAAGCTGCTGTTTATGTATC
GACTCTATGACATGAAGATAGAGCTAACTGTACTTGCTGGATAGAAATACTGCGGTGGAA
CCTGGCAAGGAATCATAGATAAGGTCAGTAACGCTCTAATCCTTCATATATCACACAAC
GACCAATCCTTAGCTGGACTACATCCAAGGAATGGGCTTCACGGCAATTTGGATCACCCC
TGTAACCGGTCAATTAACGAGGACACCCCATACGGGGATCCCTATCATGGGTACTGGCAG
CAGGACATGTGAGTATCGCAAAGCAGAAAAGACAACCCTTCAACTCTGCATGCTTACTGA
CCAATATTAAGCTATGCCCTCGACTCAAACCTACGGACTGCAGACGATCTTAAGGCCCTCG
CTGCGGCTTTGCACAAACGCGACATGTATCTCATGGTCGATGTAGAGCAAACCACATGGT
AAGTCAACTCATCCGAATCATCCCCGATAATCCAGGTTGAGACTGACATGTATGGATAAA
AAGGGCTACGACGGCGCAGGTGCTGACGTAGACTACACCAAATTC AACCCCTTCAACGAT
GCAAAGTATTTCCACTCCTACTGCCCAATCACCGATTACAGCGATGACACCATGGCGCAA
AACTGCTGGCTTGGCGACAATAAGGTCTCACTGCCAGATCTGGATACACAGAGCACAGAG
GTGCAGGATATTTGGTATGACTGGGTTGGATCTTTGGTCTCCAATACTACTCCAGTAAGTTG
TTTTTCTCTCAAATTCACCCTTAGCAAGATATATCGCCATATCTAGAGACTGACCAATGT
ATAGTCGACGGCCTCCGCATTGACACAGTCAAACATGTCCAGAAAGATTTCTGGCCCCGT
TACAACAAGGCCGCGGGCGTCTACTGCGTAGGCGAGGTCTTTGATGGAGACGTCGATTAT
ACCTGTCCATAACCAGGAGGTAATGGACGGAGTGCTTAACTACCCAATGTGAGATCCAGCT
TATACATGGAATGTACCAGATACACAGGGAGAACTAAAAATAATGAACTGAAATAGCTAC
TACCCCTCCTCAAAGCCTTCCAATCGACCTCGGGAAGCATGACCGACCTATACAACATG
ATCAACACGGTGAAATCGACCTGCAAAGATTCAACCCTTCTCGGGACCTTCCTAGAGAAC
CATGATAACCCACGTTTTTGCCCTCGTAAGTGGAATTCATAAAAGCAACGGGCATAATTC
CACTCTGTATATCTAAAAGTACATCTCTCCCTTGGGAACCCAGAGTCACCAACGACATT
GCCCTCGCCAAGAACGCAGCCACATTCATCTATCATGGCAGACGGTATTCCATATCGTCTAC
GCAGGACAGGAGCAGCACTATAGTGGCGGCGAGGACCCAGCTAATCGTGAGGCTCTGTGG
CTGTCTGGATACAACACGGACAGCGAGCTGTACAAGCTCATTGCGACGGCCAATGGTGCT
AGAAATCAGGCGATTGCAAAGAGTACCAACTATACTATTTACCAGGTATGTGCTTGTCTC
TCTGTCTCAAGTGAATGAAGAAAGGAAGGACAGAAAAAACTAACTCCGTCTTCACAGAAC
TACCCAATCTACAAAGACGACAGCACCATTGCCATGCGGAAGGGCTATGATGGTGGGCAG
ACAATTACCATCCTAACGAATCTCGGCGCAGGAGGTAAAGAGTACTCGGTTTCGATTCCCT
GGTACTGGATTTCGACGCTGGTGCGAAGTTGACAGAGGTTGTCTCCTGCGCCAGCGTTACT
GCTGGTGAGAGTGGGGAGGTGTCTGTTCCCTATGGCTGGTGGAGCTCCGAGAATTTTGGTC
CCACCTCTTTGCTTGAGGGCTCGACTCTCTGCTCGTCGTAG
```

>NW_015971428.1:70986-73467 *Penicillium expansum* strain MD-8
chromosome Unknown contig370, whole genome shotgun sequence
2482 bp

ATGTCTTCTACCATTGACAGCTCCAATATTCCCACCGATGGCACAGGTAAGCTTCAAATT
ACTAGGATCTTCATATCTGTTTCCAATTCTAACAAAAAATAGGTGTTATCCAAGTGGATC
CTTGTTTGAACCCCATCGCGATGTCTTGAAGCACAGATACCAGGTAGTCGAGGATTGGG
CCAAGGCCATCAATGAAACAGAGGGTGGCTTGGACAAGTTCAGCAAGGTGAATTGCATCT
GCATTGATTGTTGTTCTCCAACTAATGCGCTTACCAGGGCTATGAAACCTTCGGACTAC
ATGTACAACCTAACGGAGAGATCAAATACCAAGAATGGGCACCAAACGCACAAGAGGCTT
CTTTGGTCGGCGAATTTAGTACGTTCTATGTACTGGCCATATTTGAGGAGCTTGACTGAG
ACTGGCAGACAACCTGGGACGTCAATGCAACCCCATGACGAAGAAGAGCTTCGGCATCTG
GAATGTAACGGTACCAGCGAAGAAGCGGTGCTGCCGCTATTCCCCACGACAGCAAGATCAA
GGTAAGCACATCAGCCCTATGCATCAATAAAACACCTCACCAATAACCCCTATAGATCTCA
ATGGTGCTCCCCAGCGGCGAGCGCATCTATCGACTCCCCGCTTGGATCAAGCGCGTGGTC
CAAGATCTGAACGTGTGCGCTGCATACGATGCCGTTTTTCTGGAACCCGCCGCGAGAAGAT
TTATACAAGTTCCAGCACGCGCGGCCAAGAAGCCTGAGAGTCTGCGCATCTACGAGGCG
CACGTCGGCATCTCGTCGCCGGAGACTAGGGTTCGCTACGTACAAGGAGTTTACGAAGAAC
ATGCTGCCCCGTATTAAGTATCTGGGATACAACGCCATTACGCTAATGGCTATCATGGAG
CATGCATACTACGCTAGCTTCGGGTACCAGGTGAACAACTTCTTCGCGGCGAGCAGTCGC
TACGGATCCCCCGAAGATCTGAAGGAGCTTGTGATACAGCCCACAGTATGGGGCTCGTT
GTGCTACTTGATGTGGTTCACAGTCATGCTTCCAAGAAGCTCATTGATGGACTCAATGAG
TTGATGGAACAGACCATCTCTACTTCCATGGTGGTGCGAAGGGCCGTCACGAGCTGTGG
GACAGTCGTCTGTTCAATTATGGAAGCCATGAGGTGCTGCGTTTTCTTTTGAGTAATCTG
CGCTTCTGGATGGAAGAGTATAAGTTCGATGGATACCGCTTCGATGGTGTGACTAGCATG
CTCTATACGCACCATGGTATCGGAACGTACGTGCATTCCCTCACTATATTTTATAACAGCC
TGCTAATGAAAAGAAACAGTGGTTTTCTCCGGTGGATACCACGAGTACTTCGGACCATCCG
TTGACGAAGAGGGCGTCACATACCTCACCTCGCCAACGAAATGTTGCACGAACTCTACC
CAGAATGCATCACAGTCGCAGAGGATGTCTCCGGCATGCCTGCACTGTGTCTACCCCA
AACTAGGCGGCGCCGGCTTCGACTACCGCCTCGCAATGGCCGTCCCAGACATGTGGATCA
AGCTCTTGAAAGAAAGCACAGACGACGAGTGGGACATGGCCAACATCTCCTTCACGCTCA
CCAACCGACGCCACGGCGAGAAGACCATTGCCTACGCCGAGAGCCACGACCAAGCGTAAG
TCCAATCTTCCATCATCCCCACCCCATCCATACACAATTAACCAACTAACACAAAACCC
CACAGCCTCGTCGGCGACAAAACCCTAATGATGTGGCTCTGCGACAAAGAGATGTACACC
CACATGTCCACACTAACCGAATTCACCCCGTAATCGAGCGCGGGATGGCCCTCCACAAA
ATGATCCGTCTCGTAACCCACGCCCTCGGCGGCGAGGGCTACCTAACTTCGAAGGCAAC
GAATTCGGCCACCCGAATGGCTGGACTTCCCACGCGAAGGCAACGACAACCTCCTTCTGG
TACGCTCGACGCCAACTAAACCTAACCGAAGACCCGCTTCTGCGGTACCACTTCTGAAC
GAGTTCGATCGCGGGATGCAGCTGGCCGAGCAGAAGTACGGATGGCTTTCTTCGTGCGAG
GCGTATATCAGTCTCAAGAATGAGAGTGATAAGGTACTTGTCTTTGAGAGGGCTGGGTTG
CTTTGGATCTTCAATTTCAATTCTAAGAAGAGCTTTACGGATTATCGGGTTGGTGTGAT
GTTCTTGGGACGTATCGCATTGTGCTTGATACCGATGAGAAGGAGTTTGGTGGGCTTGGG
AGGAATGTTAAGGAGACAAGGTTCTTTACTACTGATATGGGGTGGAATGGGAGGGGGAAT
TTTGTGCAGGTTTATATTCCTACGAGGACTGCTTTGGTATGTTGTCTGACTGTTTTTTTC
CCCCCTCTCCTTCTGTCTTTGGTTCTTGTGTTGCTGACTTTCTGTGTTCTTGCAGGTCTT
GGCTCTGGAAGAGACTCTGTAA

>NW_015971418.1:c97871-95908 *Penicillium expansum* strain MD-8 chromosome Unknown contig159, whole genome shotgun sequence 1964 bp

ATGGGCTTTACTGCCATTTGGATTACTCCTGTGACTAAACAGCTCCCGCAAAACACCGGT
GATGGGACGTCTCATGGATACTGGCAGCAAGATATGTAAGGTTATTAAACGGTTTGT
GCTGGGATTCTGCTCACC AACTTCACTAGATACAATGTCAATCCAAATCATGGCACGTCC
GATGACCTCTTGGCACTCTCAAAGGCACTACACGCGAGGCATGTATCTCATGGTTGAT
GTTGTGGCAAACCACATGGTATGTTATCTTGATCAATGAGATAAAACCTTTCTAACACGC
CAACAGGGCTACGCTGGACCTGGAATACTGTGGATTATAGTGTTCCTTCACTCCCTTCAGT
TCTTCCTCTTACTTCCATTCTACTGTTTGATCAGTAACTACAACGATCAGTCCAATGTC
GAGAATTGTTGGCTTGGTGACACCATTGTCTCGCTGCCAGATCTTGACACAACGCAGAGC
TCAGTGACAGACTGTGGAACAACCTGGATTGGAGATTTAGTGTCTAAGTACTCCAGTAAG
TCTAATGGTTTATGTAAAAATCCGATCTAACATTGTGAGTTGATGGATTACGCGTCGATA
CCGTAAAGCATGTCCAGAAGTCTTTCTGGCCTGGCTTTAATACTGCTGCAGGCGTCTATG
CTGTGCGGGGAGGTCTTTGATGGAGATCCAGCTTACACCTGCGACTACCAGAAGTACATTG
ACGGTGTCTTGAATTATCCTATGTGAGATGACTGCCATGCAGTTTCCTAGAGAAAAGCTA
ACCGTCCAGTTATTACCCACTACTACGTGCATTCCAATCTTCCAGTGGCAGCATTAGCGA
TTTGTACAACATGATCGGCACTGTGGCATCCGATTGTGCAGATCCAACCTCTGCTGGGCAA
CTTTATCGAGAATCACGACAACCCACGTTTCCCGAGGTGAGACATTTGAAGTTCTCAGAG
ATATCTGATACTAACCATCTTTGATTATAGCTACACAAGTGACTACTCCCAGGCCAAGAA
TGTGATCTCATTCATCTTTTTATCAGATGGTATTCCCATTGTATATTCTGGCCAGGAGCA
ACACTATAGCGGTGGAAGTGACCCAGCCAACCGTGAAGCTATCTGGCTGTGCGGATACTC
TACCACAACAGAGCTGTACAAGTATATTGCGACTACAAACAAGATCCGCAAAGCCGCGGT
CGCGGCAGACTCTAGCTATATTACGACCAAGGTATGTATTGTAAAAGCAAAGCTGATGAA
AAGGACTGACATATTACAAGAACATCCCCTTCTATCAAGACAGCCATACGCTAGCCATAA
AGAAGGGGTGCGGCAGCTCGCCAGTTATAACGGTACTTTCCAATGCCGGATCATCTGGAT
CCTCCTACACATTGTCTTTAAGTGGTAGCGGATACTCATCAGGCGCCAAGCTGATGGAGT
TGTAACCTGCACATCTATAACAGTAGATGCTAGCGGTAATATCGCCGTGCCAATGGCAT
CCGGGTTGCCACGGGTTCTTGTCTCGCTTCTCCGTGAGCAACAGCGGAATATGCGGCT
CATCCGTTCTAGTACCACAGCCGTCACCGGACTCAGACCACTGCTACGACGACAACCA
CTACGGGGGCGGGCTGTATCCAAGCTACCGCTCTGTGAGTTCTATTCAAGGAGCTTGTGA
CCACTTCCTATGGCCAAGATATCTACGTCTCAGGATCGATCAGCCAACCTTGGTACCTGGG
ACACTAGTAAAGCCATCGCACTGTCTGCAAGCGGCTACACTACGTCCAACCCCTTGTGGC
AGGGCACTATCACCTCCCTGTGCGAACAACCTTCCAGTATAAATTCTCAAGAAGACGA
GTGGATCTTCGGCTGTGACGTGGGAAAGTGATCCTAACCGGTCGTATACAGTGCCGACTG
GATGTTCTGGAACCTACGGCCACTGTGACGGCGAGCTGGAGATGA

>NW_015971304.1:195832-197885 *Penicillium expansum* strain
MD-8 chromosome Unknown contig7, whole genome shotgun
sequence 2054 bp

ATGTGGTGGTGGGAAGGTTTTGGTGGTTGCTGCCGTTGGGACAGTACATGCGGCTTCCCGA
GACCAATGGCTCGGTCGGTCAGTCTACCAAGTGGTCACCGATCGCTTCGCTCGATCTGAT
AACTCAACCACTGCTTCTTGTGATGCAGCACTGGGAGAGTATTGTGGAGGGAGCTTACAG
GGCATCATCACCAAGCTCGATTATATTAGGAACCTCGGGTTCGATGCAGTTTGGATATCT
CCAGTGCAAAGTCAAGAGTCAACTCGCACAGCAGATCTCTCAGGTATGGCCGCCCTTGAC
TGTCAAGGAATATAGAGAACTAACGATCGATGGATGATAGCATAACCATGGATATTGGCCA
AACGACCTGTATTCCATCAACTCCCATTTTGGCACCTCCGATGACCTCCAAGCGTTATCC
GCAGCGTTGCACGCGCGTGGCATGGTGAGTCGCCAGCTACCATGCCTATTCACGAATCTG
ACATGAAAAATAGTACTTGATGCTGGATATTATTGTTGGTGACATGGCCTGGGCTGGGAA
TGCCTCCACTGTGCGACTACAGCACATTCAATCCATTCAATGATCAGAAGTATTTCCACGA
CTACAAGCTACTCTCGGAGGACCCCATAAATGACACCTGTGTTCTGGATGTAAGTCTGTC
ATCGCATGTTATGAGAGCATTGCTAACCCCTTTGTCAGTGTTGGATGGGAGACAACACCAT
ATCGCTTCCAGATCTGCGAAACGAGGATCAGGAAGTCCAGCAGATGCTGGGCACCTGGGT
TTCGCAGTTGGTTTCGAAGTACTCCAGTATGTCTATACGTTTCCCCATCTCTTCAACGGA
TTTAATAACAGTTATCATTTTTAGTTGATGGCTTGCGAATCGACAGTGTCTTGAACATTG
CTCCTACATTCTTCTCCAATTTAGCAAGTCAGCGGGTATTTTACCATGGGCGAAGGCG
CCACAAGAGATGCATACGGTTACTGTTCTCTGCAGCCTAGTCTAAGCGGACTTTTGAATT
ATCCGTTGTAAGTAGCCCATCAAAATGCACAGAGGGCGTGTTAACACTTTTATAGGTATTA
TATCCTCACAGAGGCCTTCAACACGACCAACGGAGACCTGACCAGGATTGTACAGTCCAT
CGACTACATCAGGACAAATTGCGAGGATGTACTACCCCTGGGAACCTTTCACATCGAACCA
GGATGTCCCTCGCTTTGGCTCGTATACTTACAGACATATCGGTAAGTCGACTGCATCGGGT
ATTTTGTGACGACGTATTAACTTTATCACTCCTGATTAGCTGGCTCGCAACATTCTCACA
ATCAGCATGATCGCTGACGGTATTTCCCATCCGTATGCTGCGCCCCCAAAAATAGAAACAA
AAGCCAAAGATACTAATTAAGAAATACAGTCTACTATGGGGAAGAACAGCACCTGTGAG
GTGGATTCAACCCCTGTCAATCGGGAGGCCTTATGGCTTACCAAATACTCGATGAACTCGA
CCTCCCTGCCATTGCTAGTCCAATCATTGAATCGCATTTCGATCATATGCGAGCGGTGACG
GTGAAAAGTCCACGGTCGCTCCGAAGTCAGGGAGCGACTATCTATCGTACCTCTCATTGC
CAATCTACAACCTCAACAAACATCTTGGCCACGCGCAAGGGATTTAGCGGTAACCAGGTTG
TGAGTGTGCTGTCCAACCTTGGAGCCAAACCAGCCACCAATGCCACCACCAAAAATTACGC
TTGGCTCCGACGGCACAGGATTTTCTCCCGACAAAATGTGACCGAGATCTTGTCTTGCA
AAACATTTGTTACTGATGCAGGCGGGAATCTCAATGTGGACCTCAGCTCGGATGGAGGGC
CTCGGGTGTACTACCCTACTAAAAGCCTAAAACGAAGCACCAATATTTGTGGAGATGATA
CCCGAACATCGACAACCTCCTCGGCGAGTCCGAAGACTTCCACCAGCGGTGAGAATTCTT
TATTCGGTTTATCGTGGGAGATGAGGACATTGGTAGTCACGATTGCAGTGACCACGTCTT
TCATTTCCATCTAA

>LHQR01000065.1:24329-26776 *Penicillium griseofulvum* strain
PG3 contig_80, whole genome shotgun sequence 2448 bp

TTACAGAGTATCTTCCAGAGCCAGAACCTGTAAGGGAAGTCAGCAGATATGAAAAATAAG
GGGAAGAGGTAGAAATATGAAAGACAACATACCAAAGCAGTCCTGGTAGGAATATAAACC
TGCACGAAATTCCCCCTCCCATTCCTACTCCAGATCGGTAGTAAAGAAGCGCTCTCCTTA
ACATTCCGTCCCAGCCCACCAAACCTCCTTATCATCAGTATCAAGGACAATACGGTAGGTA
CCGGGGACATCGACACCGACACGGTAATCGGTAAAGCTCTTCTTAGAATTGAAATTGAAG
ATCCAGAGCAGTCCAGCCCGCTCAAAGACGAGTACCTTGTCGCTCTCGTTCTTCAGACTG
ATATACGCCTGCGGCGCAGAAAGCCATCCGTACTTCTGCTCGGCCAGCTGCATTCCGCGG
TCGAAGTCGTTTCAGGAAGTGGTACCGTAGAAGGGGGTCTTCGGTTAGGTTTAGTTGACGT
CGTGCGTACCAGAAGGAGTTGTCGTTGCCGCGCGTGGGAAGTCGAGCCATTCGGGGTGT
CCGAATTGTTGCCCTTGAAGTTTAGGTAGCCTTCGCCGCCGAGGGCGTGGGTTACTAGT
CGGATCATTTTTGTGTAGGGCCATGCCGCGTTTCGATTACAGGGGTGAACTCGGTTAGTGTC
GACATGTGTGTGTACATCTCTTTGTCGCAGAGCCACATCATTAGGGTTTTGTGCGCCGACG
AGACTGTGTGTGTAGTTGGATGAATGGGGATTTTGGAGGTGTGGGATTTTAGGCTTACG
CTTGGTGCTGGCTCTCGGCGTAGGCAATGGTCTTCTCGCCGTGGCGACGGTTGGTGAGTG
TGAAGGAGATGTTGGCCATGTCCCACTCGTCGTCTGTGCTTTCCTTCAAGAGCTTGATCC
ACATGTCTGGGACGGCCATTGCGAGGCGGTAGTCGAAGCCGGCACCGCCTAGTGCATGAG
GTAGACATAGTGACGGCATGCCGGAGACATCCTCTGCGACTGTGATGCAATCTGGATAGA
GTTTCATGCAGCATCTCGTTGGCGAGGGTGAGGTATGTGACGCCCTCCTCATCGACGGATG
GCCCCAAGTACTCGTGGTATCCACCAGAGAAGCCGCTGTTTCTTCGATTAGTATAATTCT
AAATGGTAGCAGAAGAATGTACGTACGTTCCGATACCATGGTGCGTATAGAGCATACTGG
TCACACCGTCGAAGCGGTATCCATCGAATTTATACTCTTCCATCCAGAAGCGCAGATTAC
TCAAAAGGAAACGCAGCACCTCGTGGCTTCCATAATTGAACAGACGGCTGTCCCAGAGCT
CATGACGGCCCTTCGCACCGCCATGGAAGTAGAGGTGATCTGTTCCATCAAACCTCATTGA
GTCCATCAATGACGTTCTTGGACGCATGGCTGTGAACCACATCGAGCAGCACAACCAACC
CCATACTGTGAGCTGTATCAACAAGCTCCTTCAGATCCTCTGGTGATCCGTAGCGACTGC
TCGCCGCGAAGAAGTTGTTACCTGGTACCCGAAGCTAGCATAGTATGCATGTTCCATGA
TGGCCATTAGCTGGATCGCATTGTACCCAGATACTTAATACGGGGCAGCATGTTCTTGG
TAAACTCCTTGTATGTAGCGACTCTAGTCTCCGGCGACGAGATGCCGACATGGGCCTCAT
AGATGCGCAGGCTCTCGGGCTTCTTGGGCCGCGTGTGCTGGAACCTTGATACCTCATCTG
CGGGCGGGTTCCAGAAAACGGCATCATATGCAGGCGACACGCTCAGGTCTTGCACCACAC
GCTTGATCCAAGCAGGGATTTCGGTAAATGCGCTCGCCGCTGGGGAGCACCATTTGTGATCT
GTTGCGATTCTTAGTGGGTTTTGCTCTATTATCCATAGGACTGATGTGCTTACCTTGATCT
TGCTGTCTGTGGGAATAGCGGCAACGCCGTTCTTCGCTGGTACCGTTACATTCCAGATGC
CGAAGCTGTTCTTCGTATGGGGTTGGCATTGACGTCCCAGTTGTCTGCCAGTCTCAGTT
CTAGTCTCCTTGAATATGGGCAGTACACAACGTACTAAACTCGCCGACTAATGAAGCCTCC
TTTGCGTTGGGTGCCCATTTCTTGGTATTTGATCTCTCCGCTGGGTGCGCATGAAGTCCG
AAGGTTTCGTAGCCCTGATAAGCGTGTTAGTACAGAGAATAGTAACCAATGGACATGAAT
TCACCTTGCTGAACTTATCCAAGCCACCCTCCGTCTCTTTGATGGTCTTGGTCCATTTCT
CGACTACCTGGTATCTGTGTTTCAAGACATCGCGATGAGGTTCCAACCAAGGATCGAGCT
GGATAACACCTATTTTTGTTTAGAATCGGGATCACATTTGAATTTAGCATTTGGTCGCAAG
CTTACCTGTACCATCATTGGGAATATTTGAGTCAATTGTAGAAGACAT

>LHQR01000070.1:213525-215227 *Penicillium griseofulvum*
strain PG3 contig_85, whole genome shotgun sequence 1703 bp

TCAAAGGAGCGTAATGACGATGCTGGTCACCACTCCTAGCAGGGTAGCTAGACTGGCACC
ACTCGTAAATCGGATGCCAGCCGACGTCAACCCATTGTGAGTCTTCAGCATCGCGAGGGA
AACGTTTCGCAGAAGAATAGCCACAAAGACCACTGCCTTCCATGTATTTTGTGGGGAAGTA
GACTCTGGGTTCTCCCTTATCCATAGGGACGCTCAACATAACCCGCGTCATCGACAGTTTG
GTTTCGTACAGCCCAAATTTTCGGTTACCTTGGTACCAGCATTAAGCTGACAGCCAAGTC
TATTTTGTACGCTTTACTGGCCGAGCTTTGGCTGGACAATAACCATGACAACCTTGTCGACC
CTGAACACCTTTTGTGAAAGCAAGCTCACTGCCGCCCTGGTAGATTGTGTGGGTGTCGTC
CTCGAAATAGTCTTCGCCCAGCAAGGCTGCGTGCTTGCGGAGGCGGTTTAGCTTTGCGAT
CATCTTATAGAGCTCCGCGTCGGTGTCATATTTTCGTGAGCCAGATGGCTTCTCGGTTCTT
GGGCACTGAGTCGCCGCCAGATGTTGCTCTTGGCCTTGATATATCATCGGGATTCCATC
AAATAGCATGGTAAATACTAGGATGTTTTTGGCCATCTGCAAAATATTTATGATCAACAA
AAAGTGATCACTCACACGGAAGAGGATATACATACCGCCATGTCCTTGGAATAGCTCGCA
ATCCGCGCCTTGTCGTGATTTTCAGAGAAAGAGACCATAGCATTGACATCTGGGATCGAG
ACTCTCATATTCTCCACTCCTATCGCCAAGGCGGATGTATTGCCCATGGTAAAAGCCTCT
AGGATTTGGAATAGATCGGATAGTTTGGCAAACCTGGCGATGTAGTTGCTCTGGTAATCG
TTCATGATGCTGACTGCGCCTTCAAGGACTTCCCCTGTCATGAAAATGTTGTCGAGGCCG
TCGGCAAAGATTTTAAAAAATTCTGGGTTGACGTGCTTGGCTGCATCAATGCGGAGCCCCG
TCAATGGAATATGTCTTTATGGCGTCTTTCGCCCATTTGATCAAGAGCTTTTGGACATCT
TCGTGCTCTGTGAAAAGATCTGGTAGTGGGACCGTCCAATCACCCGTCGAGCACTTCTGC
GCAATCTTCATATCATTCAGTCTGTCATGTTGCAGTACGTATGGTAATAGTCGGCGTTA
TTGAAGGGTTCCAAGACGGAATAGTCGATATTTGTGGCGGGATTGCTACCATTCGTGATA
TAGGCCATATTGTTGATCACAGTGTCCAGCATCAAGTACATGTCCCTGGAGTGGAGAGCG
GCACTAAGGTCGAGCAAGTCTTGATGCGTCCCAAAATGAGAGTTGAGTTTGTGTAAGTTT
AATGGCCAGTACCCGTGGTAGGCTTCGCCATACTCGACTCGGCCATGGATATTCTCCATG
ATCGGAGAGATCATCACAGCATCAAATCCCATTCTTGGATGTAGTCGAGTTTGTGCGATA
GTTCTTCGCCATGTTCTCCCGAGTAAAGGCCCTTCTTGGTGTGTCATGGTGATGTTGTC
GATCCGTCTGTGCGAGCAAAACGATCTGTCATAGTCTGGTATACTGATCTACGCTTCCAG
TCGGCTGTAGTTGCGGCTGACGCCGAGGCGATGAGCCCCGTAATCAACAGGCCTACCAAC
GAACGAATGGTGCAGCGTGACAT

>NPFK01000092.1:73005-74733 *Penicillium* sp. 'occitanis'
strain CL100 contig_92, whole genome shotgun sequence 1729
bp

TTACAACATAAACAGACTTGATAAAATCAAGATCGATAGTCCTAGCCATGTAGAGGCTTT
GACAGTTGGACCAGCTCCTTGTGGTAAGGATGAGCTAGCAGCTGGTGTACCCGAAGAAGT
GGTATTCGAAGAACCAGACGACCCCTTCGACGACGGCGAGAAAGAAGACGATGACGAGAA
ACCGCACAACCCAGACCCATTCAAATTAAAAGTCGGGTAATAGACTCGCGGCTGCCCCCTG
ACCCATGGGAACTGTAATTGTGCCATTCTCCCCAGCGACAACGGTACTATTGCACAAGGT
CACTTCCGTCAAATTCATCCCCGGATCTGCAACACCAGGAACTTGCAGCGTATAATCGCC
GCCTTGTAAGCCCTGATTTGATAAGACAGCAACAATCTGTGCGCCATTGGGACCCTTGCG
AGTGGCATATGTGGATCCATCCGTGTATAGGATTGAGCTCCAGTTTGTACGTAATGGTC
GTTGATAGAGATGGCGTGGTTGCGGAGTTTGTTC AATGTTGCTGTAAGATTGTATAGATC
GGTGGATGTATTGTACTGTGTAGGCCATAGAGCTTGTGCGTTGTATGGAGAGTAGTTGCC
AGGTAGATGTTGCTCTTGGCCGTAGTACATCTTGGGTATCCCATCACTCAGGATGGTGAA
GGCGAGTGCATTTTTTTGCCAGCTAACCATGTCAGTATACAGTAACGGAGAGCGAGTTGTA
TGGTATAGGTACTCACAGCAATATCTTGGGTCAACGTCGCAAATCGAGGATTATCTTGAT
TTTCAATGAAATTTGCAAGATACTGAGGTGATTGGCAAGCCTGACGCATCGCTCCTACCA
TCGAAACAAGATCCGCCATCTTGCCAGCCGTAAAAGCATCAATAATCTTCCCATATAAGG
CATAATTCTCCAGTCCGGAGGTAAGATTCTGATAGCCGCACAAAACTCGGCGTCACCAT
CATACACCTCGCCCATAGCATAAACGCTGGCACTGTTGGTGAAATTGGGAAAGAAATTTG
GCTCGATCTGCTTTGCTCCATCTATCCTGATACCATCAATATTATACGTGCTAACCAGAT
CAGCAATCCATTGATTAAGTGTGCGAGCAATGGTTGGTTCGGTAGTCTTGATCCGCGGTG
TAGCAACACCCTGATATCCAAGCCAGCAGTTTGTGTATTCTGTCTGATTTCGACCAGTCGA
CAATAGGACAGTAAGGAGTAAAGTCGGAAGACTGGTTGAACGGAACAAAGACCGAATAGT
CGATAAGTGTGGAATTGGCAGCGGTCATGTTGGTTCCGCCAACGCTGTAAGCAAACATCAT
TCGCCACCACATCCACCATCAGATACATGTCACGTTTGTGTAGTTCCGAAACCAAATGGT
TCAGATCATTGGCTGTACCGAAATGAGCATTTCAGTTTCGTAAAGGTTCTGTGGCCAGTACC
CATGAAACGCTTCCCCGTAGATGGTATCTTCAGGCAAGTTCTCCTGAATCGGCGAGATTT
GTACAGCCGTGAATCCCATTTCTTGGATATAGTCAAGCCGGTTGACGAGTCCGGACCAGG
TGCCGCCGCAATATTTGGTGACGTTGCAGTTATCAGTAGAGTCTACTGGCCGCGCATAAC
GGTCCGTGATGACTTGATAGATGGACCTTTTGGCCAGTCATCCGCTGATGAAGCATTGG
CACTGGCAGCAAATGCCAATGCAGTTGCAACTATGGCCAACGGCTTCAT

>NPFK01000226.1:2812-5130 *Penicillium* sp. 'occitanis' strain
CL100 contig_226, whole genome shotgun sequence 2319 bp

ATGAAGTTGCCCCAACGTTTCTCTTGTCTGGAGTGCTCTTGCCAGCGTAGCACTAGGATTG
ACTGCGGATGAATGGCGTAGTCAATCAATCTATTTCTTGCTTACAGATCGTTTTGGGTTG
ACCAGCAATTCTACTACGGCTTCATGTGATGTTGCTGATGGGGTGAGTTGAGGCAACCCC
CACTCCATTGACTACCAATAGCCCTAATACTGACGCGATTAATAGTTATACTGCGGTGGT
AGCTGGCAGGGAGTGATCAACCATGTACGCTGTTACAGTCATACCATATATCAATCCAG
GGTTAGTGATTGACTTGCTTTCCACAGTTGGATTACATCCAAGGCATGGGGTTCACAGCA
ATATGGATAACACCCGTAACCGAAAACCTTCGAAGGCTCCACCTCCGATGGCGAAGCTTAT
CATGGCTACTGGCAGCAGAATGCGTAAATACGATCCGATAATGCCGCATGTTGAACTATG
ACCAAAGTATCTGACTTTGACTCCCGTTACAGTTACTCGACGAACTCTCACTATGGTGGA
TCTTCAGACTTGCTCAAACCTTTCTGAAGCGTTGCACGCGAGAGGAATGTACCTCATGGTC
GATATCGTAGTAAACAACATGGTACGCAATACCCCCATCAGGACCCTAGACAAACCGTCT
AACTAAAAGGATACAGGCATACGATGGAGCGGGTACCAGCGTCGACTACAGCATTTTCAA
TCCTTTCCCATCGCAAAGTTACTACCATTCTTACTGTCTGATAAACTATAACACCTACAA
CGCGACTAATTGGAATGATTGCTGGGAAGGAGACACCATTGTCTCTTTGCCAGATCTCGA
CACTACTCAGACCTACGTGAAGGATACCTGGAATGCGTGGGTCAAGTCATTTGTAGCCAA
TTATTCCAGTATGTGTCTCCCGAATCCCTGCCGAGTATCTCTAGGTATCTGTACTGACTG
CTTGATAGTTGACGGACTTCGAATCGACTCCGCAATGCATATCCAGCAGGACTTCTTCAC
TGCTTTCGAAGAAGCAGCTGGCGTTTACTGTATTGGAGAACTGGATTATGGCGACCCAGC
AGTCGTATGCCCCGTATCAGAACGTTCTGAGTGGTGTCTGAATTATCCGATGTAAGCTGC
ATCCACACTCTCGATCACTGTTATTGGGGTTACTAACGGTGCGGTATAGTTACTGGCAAT
TGCTCTACGCCTTTGAGTCCTCTAGCGGCAGTATCAGCAATCTGTACAACATGATCAACA
CTGTCAAATCCGACTGCGCCGACACGTCTCTTCTCGGAACTTTATTGAGAACCACGACA
ATCCGCGATTTGCATAGTAAGCCACCCATCTTCCTCAACCCAGATATTTCTGACACCGGT
CTTAACAATCAACAACAAACAGCTACACAAGCGACTACTCCGAAGCCAAGAATGTCATCT
CCTTCATCTTCTTGACTGACGGTATCCCGATCTTGTACTATGGACAAGAGCAGCACTACA
GCGGAGGAAACATTCTCTCAACCGTGAAGCTCTCTGGACATCATCTTACTCGACCACTG
CACAGTTGTATACTCATACAAAGACTTCAAACGCCATCCGTTTCGTTGGCTATAGCCAAGG
ACTCGGCTTACTTGACGTATCAGGTGAGATTCACCCTCCCCCTACAAACACGCTTGACGTA
TTGACTAACAGAAAATAGAATTACCCCATCTACCAAGACTCCAACACCATTGCCATGCGC
AAGGGTACAACAGGCCTGCAATTAGTCACTGTGCTCTCCAACCTCGGCGCAAGCGGTAGC
TCTTACACACTCACCCCTCAGCGGCAGCGGGTACACATCCGGTACTGTAGTCACAGAGCTC
TACACCTGCACAAACGTGACTGTCAGTTCCAGCGGCACAATCGCCGTGCCCATGGCTTCC
GGCTCACCGAGAGCATTCCTGCCCTGGTCTTCCGTCTCTGGTAGCTCGTTATGCAACGGC
GCTGGTTCAGGCTGCACAGCCGCATCAACAGTTGCAGTCACATTCGAAGAAGTAGTCACC
ACCACCTACGGCCAGGAAGTCTATCTCACCGGATCGATCAGTCAACTCGGCTCCTGGAGT
ACATCTAGCGCAGTCCTGTTGTCGGCGGCTCAATATACCTCTTCTGATCCGTTGTGGACT
GTTACGGTGAATCTTCCTGCTGGCGAGTCGTTTCAGTATAAGTTTATTATTGTGAATAGC
GATGGCACTGTTGAGTGGGAGAGTGATCCGAACAGGAGTTATACGGTGCCGACGGGTTGT
CAGGGTTTAACTGCAACTGTTGATGATACTTGGAGGTGA

>NPFK01000433.1:10004-11843 *Penicillium* sp. 'occitanis'
strain CL100 contig_433, whole genome shotgun sequence 1840
bp

CTAACAAGGATGTCCGTTCTCAAGTAGCTTGGCAGCAGGGTACAACACGCTGGGCCATCC
ACTAGCCATTGGCACGGAGACATCACCAGTGTGCTAACAGTGATGTTTGTGCAGGTGAT
CAACTCGGTAATGACCTGTCCGGCGGTAAAGCCCGTTCCGGAGATTGTCAAGCTGTAAGA
GCTGGCGTCTGCACCGGAGTTTGAGAGTACGGTGACGACCTGGCTGTCGTTGCTGCCTTT
GCGGATGGCGAGGTTGTTGCTATCTTGGTAGATTGGGGAAGACTGAAATCGCTGTTAGGC
ACTGGCTCTCCCAATGTAGGGAGATACGATGCATACCTTGTAAGTAGTGTATCCTGTGTC
CAATTGAAGAGCATAGTTTCGGATCTTGTTGAGCTTCGAAATCCATTGGTAAAGCTCAGC
GGAAGTATCAAACCCATTCAACCAAACGGCTTCACGGTTATTAGGAACGCTGCCACCACT
ATAATGTTGTTTCTGACCGGCATAGATAATCGGGATACCGTCCGACAAGATCGTGAAAGC
AATGACGTTCTTGCGGAGCGAAAAGTCCGAGGTGTAGTTGGCGAATCGCGGGTTGTGCTG
GTTCTCGGAAAAGGAGCCTAGCAAGGTTGAGTCATTGCAGTCGGACTTGACGGTGTTGAC
CATGTTGTATAGATCAGAGATACTACCGCTGGTGCTTTCAAAGGCGCGAACGAGTGGGTA
ATATACTGGGTAGTTCAGGACCCCGTCGAGGTAGTTCTGGTAAGGGCATGCAATGGTTGC
GTCGCCATTGTGCACTTCGCCAACGCAGTAGACGCCAGCTGCGCTGACCCAGGAAGGCCA
AAAGTCTTTTTGCACTTCTAGAGCGGAGTCAAGACGGAGACCGTCGACTTTACAATTCAT
TAGCATCGGGGGTCTTCCGATGGTAAGTTCAAGGAAATGAGCAGCACTTACTGGAGTAGT
TTGAGACCAATTCCGGAATCCAGCTGTACCACATGTTCTGCACATCAGTACTCTCGGTAT
CGAGATCTGGAAGTGAGACAATAGTGTGCCTTCCCAGCACTCTTCAACCATGGTCAAGT
TGGAGTAATCAGTGATTTTCGAGTAAGCATGGAAATAGTCTTGGCTGTTGAAAGGAGTGA
AAACTGAGTAGTCTACGTCTGGACCGGCACCGGCGTAACCCTTTTGACAAAAGATAAGTT
TGATTGACTACCGACAAAAAATTTGGAGGTAGACTTACCATGTGGTTTGCCACGACGTCA
ACCATGAGGTACATATCACGAGCATGGAGAGCTGTAGCCAAAGCTTTCAAGTCTTCGGCG
GCACCGTAGTTTGAATTGATAGAGTAAGTGTTCGACGTCAGTCCCAGTTTGAAGAGCA
GTCAAATGTCAGACGTGCATGTCCTGTTGCCAGTAGCCGTGATAAGCCTCTCCATCTGCA
GTAGATTGATTCAACTGCTCAGTAACAGGAGTAATCCAGATGGCCGTGAATCCCATGTTT
TGGATATAATCCAAGTGTACAGATCGTTTTTAGTTTTGTCAATACTTTAAGAGCCCCGACCG
TTGTACTCGACGTACCTGGTTGATGATTCCCTGCCATGATCCTCCGCAGTATTGCTATGA
AGAGTTAGTTTACATAAGTGGACTTCCAAGTCACACAACATTCAAACCTTACGCCTAACG
CAGAATCGCACTCTGCAGTGGTCAATTGTCCGTTTCGAGAGAATCGATCCGTGAGAAGAA
AGTAAATAGATCGTGAGCGCCATTCATCCGGAGTAGCAGCTTCAGCAACCTGTGCTAGAA
GACCTGCAACTGCAGCGCTTGCGATGAGCGACAGCTTCAT

Lampiran 2. Penjajaran tiga urutan α -amilase untuk menentukan templat.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

NW_015971310.1	-----ATGGTTCTCGCAGCATTTGCTTGGCTTACAGGTTGGTTGGCACTGCTATTGC	53
LHQR01000070.1:213525-215227	TTAAGGAGCGTAAATACGATGTGGTCACCACTCCAGCAGGGTAGCT----AGACTG	56
NPFK01000433.1	---TTC--ACAAGGATATCCGTTTCAAGTAGCTTGGCAGCAGGGTCAA----ACGCTG	52
	* * * * *	
NW_015971310.1	TGCCACTCCAGCTGAATGGCGATCGCAGTCGATCTACTTCATGCTCACTGATCGCTTGC	113
LHQR01000070.1:213525-215227	CACCACTTCGTAA--ATGGATGCCAGCCGCGTCAA-----CCATTGTGAGTCTTCA	107
NPFK01000433.1	GGCATTCCACTA--GCATTGGACGGAGACATCACAGTGTCTGCTAACAGTGTGTTTGT	111
	*** * * * *	
NW_015971310.1	GGGAACGGATGGCTCGACTACTGCTTGCTTGCGATACCACTGATAGAGTAAAGCTGCTGTTT	173
LHQR01000070.1:213525-215227	GCATCGCGAGGGAAACGTTCCG--AG----AAGAAAGCCACAAAGACCACTGCCCTCC	160
NPFK01000433.1	GCAGGT-GA---TGAACTGTCGCGCGGTAAAGGCCGTTCC	159
	** ** * * *	
NW_015971310.1	ATGTATCGACTC-----TATGACATGAAGATAGA-----GCTAACT	209
LHQR01000070.1:213525-215227	ATGTATTTTGTGGGGAAGTAGACTCTGGGTTCTCCCTTATCCATAGG---GAGGCTCAAC	217
NPFK01000433.1	GG--AGATTGTCAGCTGTAGAGCTGGCGTCTGCACCGCAGTTTGAAGTAAAGGTCAAG	217
	* * * * *	
NW_015971310.1	GTACTTGCTGGATAGAAATACTCGGCTGGAACTGGCAAGGAA-----TCATAGATAAG	263
LHQR01000070.1:213525-215227	ATACCAGCGCTCATCGACAG--TTTGGTTGCTACAGCCCAAATTTCCGTTACCTTGGTACC	276
NPFK01000433.1	ACCTGGCTGTCTTTC---TGCCCTTTCGGATGGCGAGGTTGTTCTATCTTGTGTAGA	272
	* * * * *	
NW_015971310.1	GTCACTAAAGCTCTAATCC-----TTCATATATCAACAACTGACCAATCTTAGCTGGA	318
LHQR01000070.1:213525-215227	AGCATTAAAGCTGACAGCCCAAGTCTATTGTACGCTTTACTGCCCCAGGTTTGGCTTGG	336
NPFK01000433.1	TTGGCGAAGACTGAATCG-----CTGTAGGCA---CTGGCTCTCCCAATGTAGGG	321
	** ** * * *	
NW_015971310.1	CTACTCCAAGGAATGGGCTTCAGGCAATTTGGATCACCCCTGTAAACGGTCAATTAAAC	378
LHQR01000070.1:213525-215227	CAATAG-----CATGACAACTTG--TCGACCCCTGAACACCTTTGTGAAA	379
NPFK01000433.1	AGATAG-----	327
	* *	
NW_015971310.1	GAGGACACCCCATACGGGGATCCCTATCATGGGTACTGCGAGCAGGACATGTTGAGTATCG	438
LHQR01000070.1:213525-215227	G-----CAAGCTCACTGCGCCCTGTTA-----GATGTTGTTGGTCTCG	418
NPFK01000433.1	-----GATGATACCTTGTAA-----AGT	345
	* * * *	
NW_015971310.1	CAAAGCAG-AAAAGACAACCTTCAACTCTGCATGCTTACTGACCAATTAAGCTATGC	497
LHQR01000070.1:213525-215227	TCCTCCAAATAGTCTTCGCCCAAGGCTGCCTGCTTGGCGGAGGC--GGTTAGCTTTGC	477
NPFK01000433.1	----AGTGTATCCTGTCTCCATTGAAGAGCATAGTTCCGATCT--TGTGAGCTTCCGA	399
	* ** * * * *	
NW_015971310.1	CCTCGTCTCAACTACGGACTGCAGACGATCTTAAGGCCCTCGCTGCGGCTTTGCACAAA	557
LHQR01000070.1:213525-215227	GATCATCTTAT-----AGAG	492
NPFK01000433.1	ATTCATTTGGT-----AAAG	414
	** *	
NW_015971310.1	CGGACATGTATCTCATGGTCGATGTAGAGCAAACCAATGGTAAGTCAACTATCCGAA	617
LHQR01000070.1:213525-215227	CTCCGCTCGGTGTATATTT-----CGTAGCCAGATGGCTTCTCGGTTCTTGCGCA	545
NPFK01000433.1	CTCAGCGGAAGTATCAAAACC-----ATTCAACCAACGGCTTACGGTTATTAAGAA	467
	* * * * *	
NW_015971310.1	TCAATCCCGATAATCCAGTTGAGATGACATCTATGGATAAAAAGGGCTACGACGCGC	677
LHQR01000070.1:213525-215227	CTGATCCGCGGCCAGATGTTGCTCTTGGCTTGATATATCATCGGGATTCATCAATTA	605
NPFK01000433.1	CGCTGCCAGCACTATAATGTTGTTCTGACCGGCATAGATAATCGGGATACCGTCCGACA	527
	* * * * *	
NW_015971310.1	AGGTGCTGACGTAGAC-----TACACCAAAATCAACCCCTTC--AAGGATCAAAAGT	727
LHQR01000070.1:213525-215227	GCATGTAAATATAGGATGTTTGTGGCCATGTGCAAAATATTATGATCAACAAAGT	665
NPFK01000433.1	AGATCTGTAAAGCAATGACCTTCTTGGCGAGGAAAGTCCGAGGTGTAGTTGCTGGAATC	587
	* * * * *	
NW_015971310.1	ATTTCCACCTCACTGCCA--ATCACCGATTACAGCGATGACCATGGCCAAAACCT	784
LHQR01000070.1:213525-215227	GATCACT-----CACACGGAGAGGATATACATACCGCCATGCTCTTGGATAGCT--	716
NPFK01000433.1	CGGGTGTCTGGTCTCTCGAAAGGAGCCTAGCAAGTTGAGTCAATTCGACTCCTCACT	647
	* * * * *	
NW_015971310.1	GTTGCTTGGCGACATAAGGTTCTCACTGCGAGATCTGGATACACAGAGCACAGAGTGC	844
LHQR01000070.1:213525-215227	-CGCAATC-CGCGCTTTGCTGTGATT--TTCAGAGA-----AAGAGACCAT--AGCAT	764
NPFK01000433.1	TGACGCTG-TTGCATGTGTATAG--ATCAGAGA-----TACTACGCTGCTGCTTT	698
	* * * * *	
NW_015971310.1	AGGATATTGGTTATGATGGGTGGGATCTTGGTCTCAACTACTCCAG-TAAGTTCTTT	903
LHQR01000070.1:213525-215227	-GACCTCTGGTTCGAGACTCTCATATTTTCCACTCCTATCCGCAAGCCGATGTATTGC	823

NPFK01000433.1	-C A A G G C C G G A C G A S T G G G T A A T A T A T T G G G T A G T T C G G A C C C C T C G A G S T A G T --	755
NW_015971310.1	T C T C T C A A A T T C A C C C T T A G C A A G A T A T A T C G C C A T A T C T A G A G A C T G A C C A A T G T A T A	963
LHQR01000070.1:213525-215227	C C A T G G T A A A A C -- C T C T A G G A T T G G A A A T A G A T - C G A T A G T T T G G C A A A -- C T G G	877
NPFK01000433.1	- T C T G S T A A G G G C -- A T G C A A T G G T T G C G T C G C C A T - T C T C A C T T C G C C A A C -- G C A	807
NW_015971310.1	G T C G A C G G C C T C C G A T T G A C A C A G T C A A A C A T G T C C A G A A A G A T T T C T G G C C C G G T T A C	1023
LHQR01000070.1:213525-215227	C G A T G T A G T T G C T C T G T A A T -- C G T C A T G A T G C T G A C T G C G C C T C A A G G A C T T C C C C	935
NPFK01000433.1	G T A G A C G C C A C T G C C T G A C - C A G G A A G -- C C A A A A G T C T T T T G C A C T T G C T A G	861
NW_015971310.1	A A C A A G G C C G C G C C G C T C T A C T C G T A G G C G A G G T C T T T G A T G G A G A C G T C C A T T --	1078
LHQR01000070.1:213525-215227	T G T C A T G A A A A T G T T T C G A G G C G T C G G C A A A G A T T T T T A A A A A T T C T -- G G --	986
NPFK01000433.1	----- A G C G G A G T C A A G A G G A G A C C G T C G A C T T T A C A A T T C A T A G C A T A C G G G G	912
NW_015971310.1	- A T A C C -- T G T C C A T A C C A G G A G T A A T G G A C G G A G T G C T T A A C T A C C C A A T	1127
LHQR01000070.1:213525-215227	- G T T G A C G T G C T T G G C T G C T A T G C G G A G C C G T C A A G G A A T T G T C T T T A T G G C G T	1045
NPFK01000433.1	T C T T C G A T G G G A A A T T C A A G G A A A T G A G C A G A C T T C T G G A G T A G T T T G A G A C C A A T T	972
NW_015971310.1	G T G A G A T C C A G G T T A T A C A T G G A A T G T A C A G -- A T A C A C A G G A G A A C T A A A A	1179
LHQR01000070.1:213525-215227	C T T T C G C C C A T T G A T C A A G A G C T T T T G G A C A T C T T C G T G C T T G T G A A A G A T C T G G T A	1105
NPFK01000433.1	C C G A A T C C A G T G T A C A C A T G T C T C T G C A C A T C A G T A C T C T G G A T C G A A C T G G A A	1032
NW_015971310.1	A T A T G A A C T G -- A A T A G C T A C T A C C C C T C C T C A A A G C C T T C C A A T C G A	1228
LHQR01000070.1:213525-215227	G T C G G A C C G T C C A A T G A C C C G T G A G C A C T T C T G C G A A T C T T C A T A T C A T T C C A G C T C	1165
NPFK01000433.1	G T G A G A C A A T A G T G T G C C T T C C A G C A C T C T T C A A C C A T G G T C A A G T T G G A G A A T C A G	1092
NW_015971310.1	C C -- T G G G A A G C A T A -- C C G A C C T A T A C A A C A T G A T C A A C A C G G T G A A A T	1276
LHQR01000070.1:213525-215227	T C A T G T G C A G T A C G T A T G T A T A G T C G G C G T T A T T G A A G G T T C C A A G A C G G A A A G T	1225
NPFK01000433.1	T G A T T T C G C A G T A A G C A T G S A A A T A G T C T T G C T G T T G A A A G A G T C A A A A C T C A G A G T	1152
NW_015971310.1	C G A C C T G C A A A G A T T C A A C C T T C T G G G A C C T T C C T A G A G A A C C A T G A T A A C C C A G T T	1336
LHQR01000070.1:213525-215227	C G A T A T T T G -- T G G C G G C A T T G C T A C C T T T C G T G	1257
NPFK01000433.1	C T A C G T C G -- G A C C G C A C C G G C G T A A C C C T T T G A C A A A A G A T A A G T T T G A T T	1205
NW_015971310.1	T T G C C T C G T A A G T G G A A A T T C A T A A A A G C A A C G G C A T A A T T C C A C T C T G T - A T A T C T A	1395
LHQR01000070.1:213525-215227	----- A T A T A G G C C A T A T T G T T G A T C A G	1280
NPFK01000433.1	-- G A C T A C C G -- A C A A A A A T T T G G A G G T A G A C T A C C A T G T G G T T G C C A G	1253
NW_015971310.1	A A A C T C A -- C A T C T C T C C C T T G G G A A C C C A G A T C A C C A A C G A C A T T G C C C T C	1446
LHQR01000070.1:213525-215227	A G T G T C A G A T C A A T A C A T G T C C C T G G A G T G G A G A G C G G C A C T A A G G T C G A G C A A G T C	1340
NPFK01000433.1	G A C G T C A A C C A T A G A T A C A T A T C A G A G C A T G G A G A G T G T A G C C A A A G C T T T C A A G T C	1313
NW_015971310.1	G C C A A G A A C G C A G C C A C A T T C A T A T C A T G C A G A C G G T A T T C C T A T C G T C A C G C A G A	1506
LHQR01000070.1:213525-215227	T T G -- A T G C T C C C A A A A T G A G A T T G A T T	1369
NPFK01000433.1	T T C -- G G C G G C A C C T A G T T C G A A T T G A T A G A G T A A C T C T T T T C G A C G T C A G T C C A G T	1370
NW_015971310.1	C A G G A G C A G C A T A T A T G T G C G C G A G G A C C C A G C T A A T C G T G A G G C T C T G T G G C T G T C T	1566
LHQR01000070.1:213525-215227	----- T G T T G - A A G T T T A A T G G C C A G T A C C G T G G T A G G C T	1404
NPFK01000433.1	T - T G A A G A G C A T C A A T G T C A G A C T G C - A T G T C T G T T G C C A G T A G C G T G A T A A G C C	1428
NW_015971310.1	G G A T A C A A A C G G A C A G C G A C T G T A C A A C C T C A T T C G G A C G G C C A T G G T G C T A G A A A T	1626
LHQR01000070.1:213525-215227	- T C G C A T A C T T G A C T C G G C C A T G G A T A T T C T C A T G A T C G A G A G A T A T C A C A G A T C	1463
NPFK01000433.1	- T C T C A T C T G A G T A G A T T C A T T C A A C T G C T A G T A A C A G G A G T A A T C A G A T G G C C G T	1487
NW_015971310.1	C A G G C G A T T G -- C A A A G A G T A C C A A C T A T A T A T T A C C A G G T A T G T G C T T G T C T C	1682
LHQR01000070.1:213525-215227	A A A T C C C A T T C C T T G G A T G T A G --	1485
NPFK01000433.1	G A A T C C C A T G T T C T G G A T A A A T C C A A C T G T A G A G A T -- C G T T T A G T T T G T C A A	1541
NW_015971310.1	T G T C T C A A G T C A A T G A G A A A G A A A G A C A G A A A A A C T A A C T C C G T C T T C A C A G A A C T A	1742
LHQR01000070.1:213525-215227	----- T C G A G T T G T C G A T A G ----- T T	1503
NPFK01000433.1	T A C T T T A A G A G C C C G A C -- C G T T T A C T C G A C G T A C C G G T T G A T G A ----- T T	1588
NW_015971310.1	C C C A A T C T A C A A A G A C G A C A G C A C C A T T G C C A T G C G S A A G G G C T A T - G A T G T G G C A G	1800
LHQR01000070.1:213525-215227	C C T -- C G C A T G T T C C T C C G A G T A A A G C C C T	1533
NPFK01000433.1	C C C -- T G C C A T G A T C C T C C G A G T A T T G C T A T G A A G A G T T A C T T T A C A T A A G T G G A C T T	1645

NW_015971310.1	ACAATTACCAT---CCTAACGAATCTCGGCGCAGGTTA---AGAGTAC-----TC	1847
LHQR01000070.1:213525-215227	-----TCCTTGTTGTTGCATGGTCAATGTTGTCGA	1562
NPFK01000433.1	CCAAGTCACACACATTCATAAATTACGCCCTAACGCAGATCGCACTCTCCAGTGGTCGA	1705
	* * *	
NW_015971310.1	GGTTTCGATTTCCTGGTACTGGATTCCAGCTGGTGCGAAGTTGACAGAGGTTGTTCTC---	1904
LHQR01000070.1:213525-215227	TCCGTCTGTGCGAGCAAAAGGATCTGTCTA---GTCTGGTATACTGATCTACGCTTCCA	1619
NPFK01000433.1	ATTGTCCTGTTCCGAGAGAAATCGATCCGTGGA--AGAAAGTAATAGATGTCGAGCGCCA	1762
	** * * * * * * * * * *	
NW_015971310.1	CTGCGCCAGCGTTACTGCTGGTCAGAGTGGGAGGTGTCTGTTCCTATGGCTGGTGGAGC	1964
LHQR01000070.1:213525-215227	GTCGGCTGTAGTTGCGGCTGACGC---CGAGG-----CGAT-----GAGC	1656
NPFK01000433.1	TTGATCCGGAGTAGCAGCTTCAGCAACCTGTG-----CTAG-----AAGA	1802
	* * * * * * * * * *	
NW_015971310.1	TCCGAGAAATTTTGGTCCACCTCTTTGCTTGAGGGCTCGACTCTCTGCTCGTCGTTAG	2021
LHQR01000070.1:213525-215227	CCCGTAATTAACGGCCTACCA--CGAAGAATGGTGGAG-----CGTGACAT	1703
NPFK01000433.1	CTGC-AAATGCAAGCGCTTGGG--TGAGGACAGCTTCAT-----	1840
	* * * * * * * * *	

Jumlah warna pada deret 2021 bp					
tosca	:383	kuning	:269	hijau	:0
				ungu	:337
Jumlah warna pada deret 1703 bp					
tosca	:383	kuning	:269	hijau	:409
				ungu	:0
Jumlah warna pada deret 1840 bp					
tosca	:383	kuning	:0	hijau	:409
				ungu	:337

Lampiran 3. Karakteristik primer hasil desain

No	Pasang Primer	Awal	Akhir	Tm	GC%	Self Complem entarity	Self 3° compleme ntarity
1.	F CTGCACCGGAGTTTGAGAGT	189	208	59.97	55.0	4.00	1.00
	R TCCGTCTTGACTCCGCTCTA	878	859	60.04	55.0	4.00	2.00
	P 690						
2.	F TGAGAGTACGGTGACGACCT	202	221	59.96	55.0	4.00	1.00
	R ACCATTGCATGCCCTTACCA	777	758	59.96	50.0	6.00	0.00
	P 576						
3.	F CGACGTCAGTCCCAGTTTGA	1355	1374	59.97	55.0	6.00	1.00
	R ATGAATGGCGCTCACGATCT	1767	1748	59.89	50.0	4.00	2.00
	P 413						
4.	F GTAAAGCCCGTTCCGGAGAT	146	165	59.82	55.0	6.00	2.00
	R AGGTCGTCACCGTACTCTCA	221	202	59.96	55.0	4.00	2.00
	P 76						
5.	F ACTACCGCTGGTGCTTTCAA	682	701	59.89	50.0	4.00	3.00
	R GCTGGGAAGGCGACACTATT	1059	1040	60.11	55.0	2.00	2.00
	P 378						
6.	F CTGTTAGGCACTGGCTCTCC	292	311	60.11	60.0	5.00	1.00
	R ATTCGCCAACTACACCTCGG	586	567	60.11	55.0	4.00	2.00
	P 295						
7.	F CCGTCCGACAAGATCGTGAA	518	537	60.11	55.0	6.00	2.00
	R GTTGGCGAAGTCGACAATGG	804	785	59.83	55.0	8.00	2.00
	P 287						
8.	F GCATGGAGAGCTGTAGCCAA	1282	1301	60.11	55.0	4.00	1.00
	R GCTTATCACGGCTACTGGCA	1427	1408	60.18	55.0	3.00	3.00
	P 146						
9.	F ACCAAACGGCTTCACGGTTA	441	460	60.18	50.0	3.00	3.00
	R TTCACGATCTTGTCGGACGG	357	518	60.11	55.0	6.00	1.00
	P 97						
10.	F GGACTTGACGGTGTGACCA	643	662	60.18	55.0	3.00	3.00
	R GACGGTCTCCGTCTTGACTC	885	866	59.83	60.0	7.00	3.00
	P 243						